SEMISYNTHESE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN IN B24–26 MIT ALANIN ODER GLYCIN SUBSTITUIERTER ALANIN-B27-DESTRIPEPTIDINSULINE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hans-Jörg Hertfelder
aus Plattenhardt

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0006

SEMISYNTHESE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN IN B24–26 MIT ALANIN ODER GLYCIN SUBSTITUIERTER ALANIN-B27-DESTRIPEPTIDINSULINE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hans-Jörg Hertfelder
aus Plattenhardt

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.1984

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weber

Meinen Eltern

ABSTRACT

Hertfelder, Hans-Jörg:

SEMISYNTHESE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN IN B24-26 MIT ALANIN ODER GLYCIN SUBSTITUIERTER ALANIN-B27-DESTRIPEPTIDINSULINE

Semisynthetische Insulinanaloga werden aus Derivaten von Des-(B23-30)-octapeptidinsulin (DOI) aufgebaut. Auf chemisch-semisynthetischem Weg werden Pentapeptidmethylester der Sequenz Gly-X-X-X-Ala-OMe (X=mono/disubst., hier mit Ala) und Di-Boc-DOI$(O\text{-}Me)_5$, mit DCC/N-Hydroxysuccinimid in Pyridin gekuppelt. Die entstandenen Des-(B28-30)-tripeptidinsuline (DTrI) werden von den Schutzgruppen befreit und gelchromatographisch gereinigt. Enzymatisch-semisynthetisch werden di-Boc-DOI und Pentapeptidmethylester in wäßrigen organischen Lösungsmitteln mit Trypsin bei pH 6,5 (Inouye et al. (1981) Biopolymers 20, 1845-1858) umgesetzt. Die variierten DTrI werden von den Schutzgruppen befreit und über Ionenaustausch- und Gelchromatographie gereinigt. Auf diesem Wege werden AlaB27-DTrI, AlaB24-AlaB27-DTrI, AlaB25-AlaB27-DTrI, Ala-B26-AlaB27-DTrI, AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI, GlyB24-AlaB27, GlyB25-AlaB27-DTrI, GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI, GlyB26-AlaB27-DTrI, GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI und GlyB25-GlyB26-AlaB27-dargestellt. Die biologischen Eigenschaften der enzymatisch variierten DTrI werden in der Glucoseoxidation an isolierten Adipocyten, der Rezeptorbindung an Rattenleber-Plasmamambranen und Anti-Insulin-Antikörperbindung in vitro, in Blutzuckersenkung und U-14C-Glucoseeinbau in Zwerchfell und Nebenhodenfettkörper der Maus in vivo ermittelt. AlaB27-DTrI und die beiden B26-substituierten Derivate sind voll aktiv. Die anderen Analoga besitzen abhängig von der Position und Art der substituierenden Aminosäure mehr oder weniger stark reduzierte Aktivitäten. Phe-B24 und Phe-B25 sind für die Wirkungsverstärkung wesentlich und können nur mit großen Aktivitätsverlusten ersetzt werden, Tyr-B26 scheint dagegen geringere Bedeutung zu haben. Die Sequenz Phe-Phe-Tyr (B24-26) ist Teil der Antikörperbindungsstelle. Phe-B24 ist hier offensichtlich Schlüsselaminosäure. Phe-B25 und Tyr-B26 verstärken die Affinität zum Antikörper sukzessive.

Diese Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen auf Anregung meines inzwischen verstorbenen Lehrers, Prof.Dr.Dr. G. Weitzel, angefertigt.
Herrn Prof. Weitzel schulde ich tiefen Dank für die Überlaßung des Themas und die großzügig gewährte Unterstützung zur Ausführung der Arbeiten. Ich bedaure sehr, daß er die Vollendung dieser Arbeit nicht mehr erleben konnte.
Herrn Prof.Dr. D. Mecke danke ich für die Unterstützung in der letzten Phase der Arbeit.

Herrn Prof.Dr. K. Eisele danke ich nicht nur in Erfüllung der Pflicht für die Betreuung der Arbeit nach der Erkrankung Herrn Prof. Weitzels,für wertvolle Hinweise, seine stete Hilfsbereitschaft, die mir die Bearbeitung des Themas erleichterte, ebenso für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. W. Sarrazin und seiner Mitarbeiterin, Frau U. Stumm, bin ich für die Unterstützung bei den biologischen Tests, ebenso Herrn Dipl.-Biochem. D. Teschner, sehr dankbar. Herrn Dr. W. Stock danke ich für die Ausführung der Aminosäure-, seiner Mitarbeiterin, Frau E. Bauer, für die Ausführung der Elementaranalysen. Diesen Damen und Herren schulde ich besonderen Dank für die anregenden Gespräche zahlreicher Arbeitsbesprechungen.

Herrn Dipl.-Biochem. A. Deger aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.Dr. U.Weber danke ich für die Ausführung der Rezeptorbindungstests und der Radioimmunoassays.

Fr. P. Tiegel danke ich für die Mithilfe bei der Anfertigung der Graphiken, der Firma PROCESS-Software Herrn C. Eichlers für die Benutzung ihrer Textverarbeitungs - anlage, die ausgezeichnete Einarbeitung darauf und Hilfe beim drucktechnischen Bearbeiten des Textes.

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Abkürzungen	6
3.	Material und Geräte	7
3.1.	Chemikalien	7
3.2.	Geräte	8
3.3.	Versuchstiere	9
4.	Methoden	10
4.1.	Analytische Methoden	10
4.2.	Präparative Methoden	14
4.2.1.	Darstellung von di-Boc-Desoctapeptidinsulin und di-Boc-Desoctapeptidinsulinpentamethylester	14
4.2.2.	Peptidsynthesen	17
4.2.3.	Methoden zur Semisynthese der Destripeptidinsuline	19
4.2.3.1.	Chemische Kupplung	19
4.2.3.2.	Enzymatische Semisynthese	20
4.3.	Biologische Tests	23
4.3.1.	Bestimmung der biologischen Eigenschaften der dargestellten Insulinderivate in vitro	23
4.3.1.1.	Glucoseoxidation epididymaler Fettzellen unter Einfluß von Insulin	23
4.3.1.2.	Insulin-Rezeptorbindungstest	25
4.3.1.3.	Bestimmung der antigenen Eigenschaften im Radioimmunoassay	26
4.3.2.	Bestimmung der biologischen Aktivität in vivo	27
4.3.2.1.	Behandlung der Tiere	27
4.3.2.2.	Blutzuckerbestimmung	28

4.3.2.3.	Zersetzung des entnommenen Gewebes und Bestimmung der aufgenommenen 14C-Glucose	28
5.	Ergebnisse	29
5.1.	Peptidsynthesen	29
5.1.1.	Synthesestrategie	29
5.1.2.	Synthese der Dipeptide	30
5.1.3.	Synthese der Tripeptide	32
5.1.4.	Synthese der geschützten Pentapeptide	38
5.1.5.	Elementaranalysen der synthetisierten Oligopeptide	44
5.2.	Semisynthese der B24-26-variierten Alanin-B27-Destripeptidinsuline	47
5.2.1.	Chemisch- semisynthetisch dargestellte Analoga	47
5.2.2.	Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Insuline	59
5.2.2.1.	Verlauf der enzymatischen Semisynthese und Aufarbeitung des Kupplungsprodukts am Beispiel des AlaninB27-Destripeptidinsulins (AlaB27-DTrI)	60
5.2.2.2.	AlaninB24-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB24-AlaB27-DTrI)	65
5.2.2.3.	AlaninB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB25-AlaB27-DTrI)	66
5.2.2.4.	AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB26-AlaB27-DTrI)	67
5.2.2.5.	AlaninB25-AlaninB26-AlaninB27-Destripeptid-insulin (AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI)	68
5.2.2.6.	GlycinB24-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB24-AlaB27-DTrI)	69
5.2.2.7.	GlycinB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB25-AlaB27-DTrI)	70

5.2.2.8.	GlycinB24-GlycinB25-AlaninB27-Destripeptid-insulin (GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI)	71
5.2.2.9.	GlycinB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB26-AlaB27-DTrI)	72
5.2.2.10.	GlycinB24-GlycinB26-AlaninB27-Destripeptid-insulin (GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI)	73
5.2.2.11.	GlycinB25-GlycinB26-AlaninB27-Destripeptid-(GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI)	74
5.2.3.	Elektrophorese der Kupplungsprodukte auf Celluloseacetat-Folien	75
5.2.3.1.	Analytische isoelektrische Focusierung auf 1 mm- Polyacrylamidgel (T5C3)	76
5.2.4.	Aminosäureanalysen der semisynthetischen Insuline	77
5.3.	Biologische Aktivität der semisynthetischen Insuline	80
5.3.1.	Glucoseoxidation an Fettzellen in vitro	80
5.3.1.1.	Chemisch-semisynthetisch dargestellte Analoga	80
5.3.1.2.	Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Analoga	81
5.3.2.	Bindungseigenschaften der enzymatisch-semisynthetisch dargestellten Insulinderivate im 125J-Rinderinsulin-Verdrängungstest an Rattenleber-Plasmamembranen	84
5.3.3.	Antigene Eigenschaften der enzymatisch dargestellten Insuline	87
5.3.4.	Wirkung der enzymatisch synthetisierten Insuline in vivo an NMRI-Mäusen	90
5.3.4.1.	Blutsuckersenkung	90
5.3.4.2.	Einbau von U-14C-Glucose in Zwerchfell und Nebenhodenfettgewebe der Maus	93

6.	Diskussion	94
6.1.	Präparativer Teil	95
6.2.	Biologischer Teil	99
6.2.1.	Testsysteme	100
6.2.2.	Untersuchung der semisynthetischen Insuline	103
6.2.2.1.	In vitro-Untersuchung in der Glucoseoxidation der Fettzellen	103
6.2.2.2.	Bindungseigenschaften der Insulinvarianten	105
6.2.2.3.	Interpretation der in vitro bestimmten Eigenschaften der variierten Insuline	106
6.2.2.4.	Bestimmung der biologischen Wirkungen der Insulinanaloga in vivo	111
6.2.2.5.	Antigene Eigenschaften	113
6.2.3.	Schlußbemerkungen	114
7.	Zusammenfassung	116
8.	Literatur	119

1. Einleitung und Fragestellung

Die Aktivität des Insulins hängt sehr stark von der Sequenz der C-terminalen B-Kette ab. Besonders wichtig sind die Aminosäuren Phe-Phe-Tyr (B24-B26), die man früher als Teil des "aktiven Zentrums" der Insulinstruktur gehalten hat (1).

Mehrere Autoren hatten das C-terminale Octapeptid (B23-30) mit Trypsin enzymatisch vom Insulin abgespalten und die biologische Aktivität des Des-(B23-B30)-octapeptidinsulins (DOI) bestimmt. Die gemessenen Aktivitäten lagen zwischen 0% und 15% (2-6); Werte um 3-5%, von Young & Carpenter (3,4) und Weitzel et al.(5) ermittelt, schienen am zuverläßigsten. Die weiteren Befunde, der stufenweise Anstieg der Aktivität bei sukzessiver Verlängerung des Desoctapeptidinsulins um die Aminosäuren Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala (5,7-10) bzw. -Threoninol und -Threoninal (B23-27) (11) auf 100% und der Nachweis von Insulinaktivität für Oligopeptide mit Bezug zur Sequenz Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr (B22-26) in vivo und in vitro am isolierten Rattendiaphragma (1,8,10,12) schienen diese Annahme zu bestätigen.

Im Gegensatz dazu sind Pullen et al. (13) der Ansicht, daß dieser Sequenzabschnitt nur ein Teil der an der Bindung am Insulinrezeptor beteiligten Aminosäuren des Insulins sei: Die drei aromatischen Aminosäuren Phe-Phe-Tyr (B24-26) bilden eine hydrophobe Region, die es jenen Strukturelementen des Insulins, die zur Übertragung des Hormonsignals notwendig sind, durch Verstärkung der Bindung erleichtert, mit dem Rezeptor in Wechselwirkung zu treten.

Diese These wird durch die Ergebnisse mehrerer Forschergruppen gestützt. Die Entdeckung und Untersuchung eines abnormen Insulins mit erhöhtem Leucin- und gleichzeitig erniedrigtem Phenylalanin-Gehalt bei einem Diabetes-Patienten durch Tager und Olefsky et al. (14,15) veranlaßte mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander (16-20), Insuline mit Leucin in B24

und B25 nach Inouye et al.(21) enzymatisch zu synthetisieren, da die Autoren die Mutation in einer der beiden Positionen lokalisiert hatten. Das Patienteninsulin (14,15) zeigte wie die kurz darauf im Labor erzeugten semisynthetischen Insuline reduzierte Affinität zum Insulinrezeptor und erniedrigte biologische Aktivität. Die Gruppen um Tager (16), Gattner (17), Inouye (18,19) und Kobayashi (20) fanden nahezu übereinstimmend, daß LeuB24-Insulin ungefähr 10%, LeuB25-Insulin nur ca. 1% der Bindungsaktivität des Insulins besaß und die In vitro-Stoffwechselaktivitäten sich analog verhielten.

LeuB24-LeuB25-Insulin war in Bindung und Wirkung noch wesentlich schwächer aktiv.Weitere Untersuchungen von Inouye et al. (19) mit B24-, B25- bzw. B26-substituierten Insulinen ergaben, daß Alanin in B24 und B25 die Rezeptoraffinität und biologische Wirkung erniedrigte, in B26 aber keinen Einfluß auf beide Parameter nahm. Überraschend war das AlaB24-Derivat dabei weniger aktiv als das Ala-B25- Derivat.

Ähnliche Auswirkungen bei Substitution mit Serin in B24 oder B25 bestätigten Kobayashi et al.(23). SerB24-Insulin war zuvor die zweite Insulinmutante, die bei einem Patienten festgestellt wurde (24).

Das erste Insulin, das eine höhere Rezeptoraffinität und biologische Aktivität als Humaninsulin hatte, publizierten 1982 Kobayashi et al.(25). Sie hatten D-Phenylalanin anstelle des natürlichen L-Phenylalanin in B24 und B25 enzymatisch-semisynthetisch (21) in Humaninsulin eingefügt und erhielten mit D-PheB24-Humaninsulin ein Derivat,das 1,8-fache Affinität zum Rezeptor und 1,4-fache biologische Aktivität besaß. D-Phe in B25 reduzierte dagegen Aktivität und Affinität drastisch.

Da die Substitution der Phenylalanine in B24 und B25 durch andere Aminosäuren zu großen Änderungen von Bindung und Aktivität gleichzeitig führte, andererseits aber die dosisabhängigen Bindungs- und Wirkungskurven der substituierten Derivate gemeinsame Maximalwerte erreichten, die mit den maximalen Werten des Insulins identisch waren, kamen Kobayashi et al. (25) zu dem Schluß, daß Phe-B24 und B25 für die Verstärkung der Rezeptorbindung wesentlich, beide Positionen jedoch nicht

nicht gleichwertig wären. B25 sei vermutlich Schlüsselposition, während B24 eher die Affinität zum Receptor beeinfluße.

Die Qualität des Insulinsignals wird durch den C-terminalen Teil der B-Kette wahrscheinlich nicht beeinflußt. Desoctapeptidinsulin ist nach Kikuchi et al.(26) trotz fehlender C-terminaler Aminosäuren B23-30 in der Lage, über den Insulinrezeptor im Fett- und Muskelgewebe in vitro maximale Insulinwirkung auszulösen, wenn es in genügend hohen Konzentrationen eingesetzt wird. Seine Dosis-Wirkungskurve ist nur nach höheren Konzentrationen verschoben. Oligopeptide mit Bezug zur Sequenz Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr (B22-26) sind dagegen bei Kikuchi et al. (26,27) an Adipocyten wirkungslos. Sie potenzieren nur bei vorhandenem Insulin oder Desoctapeptidinsulin die latent vorhandene Aktivität (26,27). Demzufolge liege das "aktive Zentrum" auf dem Desoctapeptidinsulin-Rumpf und nicht im C-Terminus der B-Kette.

Die Bedeutung der Aromatensequenz B24-26 als Verstärker der Insulinbindung und Wirkung demonstrieren auch die Resultate von Riemen et al. (28). Die Autoren wiesen den Anstieg der Insulinaktivität in drei Stufen, den Weitzel et al. (5) bei sukzessiver Verlängerung von Desoctapeptidinsulin um Gly-B23 und die Aromaten Phe-Phe-Tyr(B24-26) in vivo gefunden hatten, an Adipocyten in vitro nach. Auch bei ihnen war Desoctapeptidinsulin dosisabhängig insulinaktiv. Die Bindung korrelierte direkt mit der Aktivität. Die Dosis-Wirkungskurven der Derivate verschoben sich mit Einführen der aromatischen Aminosäuren stufenweise für Bindung und Wirkung gleichermaßen nach niedrigeren Konzentrationen. Des-(B27-30)-tetrapeptidinsulin, das C-terminal mit Tyr-B26 schloß, erreichte 59% der Bindungsfähigkeit des Insulins und ca. 50-69% der In-vitro-Aktivität (28). Weitzel et al. (5) hatten für dasselbe Derivat in vivo 61% Insulinaktivität ermittelt.

Scheint man die grundlegende Funktion der Aromatensequenz B24-26 nun als Verstärker der Rezeptorbindung zu verstehen, so bleibt dennoch unklar, welche Eigenschaften der Strukturmerkmale dieses Sequenzabschnittes des Insulins im Einzelnen

dafür notwendig sind, wie Bindung und Wirkung z.B. von der Polarität der beteiligten Aminosäuren B24-26 beeinflußt werden. Weitzel et al. (5) fanden, daß sich der Dreistufen-Aktivitätsanstieg von DOI über DOI-Gly-Phe, DOI-Gly-Phe-Phe und DOI-Gly-Phe-Phe-Tyr auch erreichen ließ, wenn anstelle der C-terminalen Aminosäuren Phe-B25 bzw. Tyr-B26 Alanin eingefügt worden war. Alanin konnte diese als endständige Aminosäuren voll ersetzen. An DOI-Gly-Phe-Phe-Tyr terminal angefügt, erhöhte Alanin die Aktivität auf 91%, nahezu die volle Insulinaktivität. Dies bestätigte die früheren Resultate von Weitzel und Mitarbeitern (7-10) und Katsoyannis et al.(11), die nachwiesen, daß Destripeptidinsuline mit terminalem Ala-B27 100% (7-10) bzw. Threoninol oder Threoninal-B27 80-100% (11) insulinaktiv, die drei C-terminalen Aminosäuren B28-30 daher für die Insulinwirkung nicht notwendig waren.

Es erhebt sich die Frage, ob diese Aktivitätssteigerung auf ca. 100% allein der Kettenverlängerung, der Abnahme der Polarität des B-Ketten-Carboxylendes, der Anwesenheit der spezifischen Sequenz der Aromaten oder allen diesen Parametern gemeinsam zuzuschreiben ist. Läßt sich in B28-30-verkürzten AlaninB27-Insulinen, die die zur vollen Aktivitäts- und Bindungsverstärkung notwendig erscheinende Kettenlänge haben,die Insulinaktivität vollständig erhalten, wenn man die Aromatenpositionen B24-26 einzeln oder zweifach mit Alanin oder Glycin variiert? Wie wirken sich diese Substitutionen im Einzelnen aus? Welche Änderungen ruft der weitere Freiheitsgrad der Rotation, von Glycin in diese Positionen eingebracht,in Aktivität und Bindung hervor? Welche Positionen können unbeschadet verändert werden? Welche Bedeutung der einzelnen aromatischen Aminosäuren im Gesamtkomplex Phe-Phe-Tyr (B24-26) kann man daraus entnehmen?

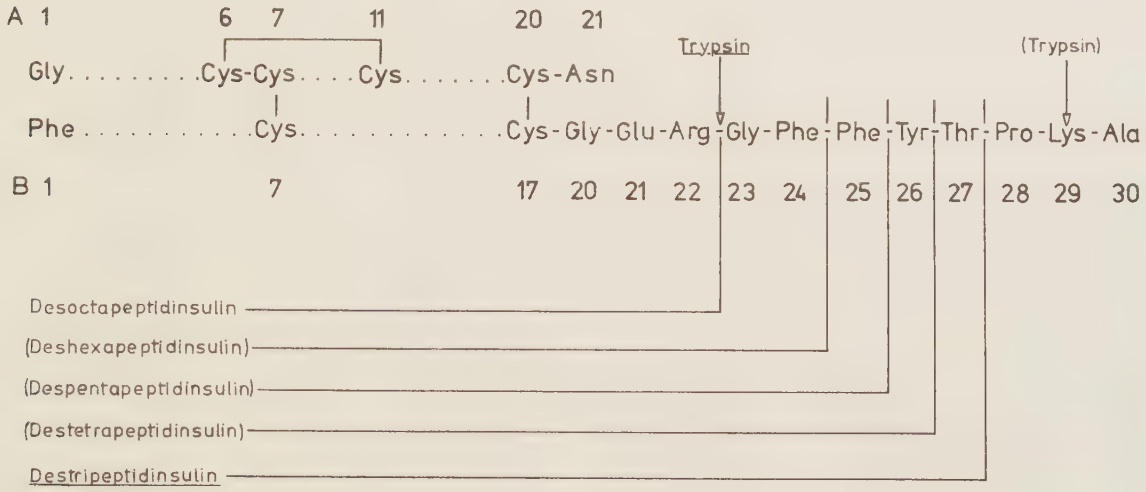

Abb. 1: Rinderinsulin und Analoga mit C-terminal verkürzter B-Kette
(↓ = Peptidbindungen, die von Trypsin angegriffen werden) (5)

2. Abkürzungen

Symbole und Abkürzungen der vorkommenden Aminosäuren, Peptide und deren Derivate richten sich nach den Regeln, die von der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur 1966/67 herausgegeben worden sind (29,30).

Weiterhin verwendete Abkürzungen:

Boc, t.-Boc	= N-tert.-Butyloxycarbonyl-
BuOH	= n-Butanol
Bzl	= O-Benzyl-
BD	= 1,4-Butandiol
DCC	= Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	= Diethylaminoethyl-
DMF	= N,N-Dimethylformamid
DMSO	= Dimethylsulfoxid
EtOH	= Ethanol
HOAc	= Essigsäure
HMP	= Hexamethylphosphorsäuretriamid
HNSu	= N-Hydroxysuccinimid
HOBt	= 1-Hydroxybenzotriazol
MeOH	= Methanol
OMe	= Methylester
TEA	= Triethylamin
TFA	= Trifluoressigsäure
Tris	= Trishydroxymethylaminomethan
DOI	= Des-(B23-30)-octapeptidinsulin
DTrI	= Des-(B28-30)-tripeptidinsulin
DOI(OMe)	= Desoctapeptidinsulinpentamethylester
I(OMe)	= Insulinhexamethylester
ug, ul, umol	= mikrogramm, -liter, -mol
a (546 bzw.578)	= spezifischer Drehwert bei 546/578 nm
IEF	= isoelektrische Focusierung

3. Material und Geräte

3.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Albumin Fr.V vom Rind	Sigma, München
L-Aminosäuren	E. Merck, Darmstadt
Ampholyte für die IEF	Pharmacia, Uppsala (S)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
1,4-Butandiol	EGA-Chemie, Steinheim
Celluloseacetat-Folien (40x170 mm)	Serva,Heidelberg
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Aldrich-Europe, Beerse
N,N-Dimethylformamid puriss.p.A.	Fluka, Buchs (CH)
Glucose	E. Merck,Darmstadt
GOD-Perid-Glucosetest	Boehringer, Mannheim
Hexamethylphosphorsäuretriamid	E. Merck, Darmstadt
Hyamine	Koch-Light
Insulin: krist. Rinderinsulin (27 I.E.)	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt a.M.
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Ninhydrin	E. Merck, Darmstadt
Ponceau S	E. Merck, Darmstadt
POPOP, PPO	Aldrich-Europe, Beerse
Pyridin p.A. getr.	E. Merck,Darmstadt
Sulfanilsäure	E. Merck, Darmstadt
Sulfosalicylsäure	E. Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	E. Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	E. Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan	E. Merck, Darmstadt

Radiochemikalien:

1-14C-Glucose, U-14C-Glucose	Amersham-Buchler,
Na125J	Braunschweig

Chromatographiematerial:	
Dünnschichtchromatographiekarten SI und SI-F (Kieselgel)	Riedel-de Haen, Hannover
Sephadex G50 fine,superfine	
DEAE-Sephadex A25	
SP-Sephadex C25	Pharmacia, Uppsala (S)
Amberlite MB6	Serva, Heidelberg
Enzyme:	
Collagenase Typ I	Sigma, München
Trypsin, TPCK-behandelt	E. Merck, Darmstadt

Die Lösungsmittel n-Butanol, Diethylether, Dichlormethan, Essigsäure, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Petroläther, Toluol und andere nicht angeführte gängige Reagentien wie anorganische Salze und Säuren wurden in analysen- und chemisch reiner Qualität von E. Merck, Darmstadt bezogen. Chemisch reine Lösungsmittel wurden teilweise nach den üblichen Methoden verabsolutiert.

3.2. Geräte

Aminosäureanalysator Liquimat III Labotron	Kontron, München
CHN-Analysator Modell 240	Perkin-Elmer, Darmstadt
Multiphor 2117-Elektrophorese- und IEF-Apparatur	LKB Produkter AB, Stockholm (S)
Fraktionssammler mit Durchfluß-photometer und Schreiber:	
Ultrorac 7000, Uvicord II und Recorder 6520 A	LKB Produkter AB, Stockholm (S)
Mikropipetten	Abimed, Düsseldorf
Mikrowaagen B5 und B6	E. Mettler, Zürich (CH)
pH-Meter	Knick, Berlin
Photometer	Eppendorf, Hamburg

Polarimeter: Lichtelektr. Präzisionspolarimeter LEP 42	Zeiss, Oberkochen
Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli	Büchi, Basel
Szintillationszähler	Hewlett-Packard, Frankfurt
Polystyrolröhrchen	Greiner Labortechnik, Nürtingen

3.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere für die In vitro Bestimmungen dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten, die mindestens 3 Tage vor Versuchsbeginn von der Süddeutschen Versuchstieranstalt Tuttlingen bezogen wurden. Sie wurden bei Versuchstierfutter und Leitungswasser ad libitum mit einem Gewicht von 120-180g zur Entnahme der Nebenhodenfettkörper verwendet.

Die In vivo Versuche wurden mit männlichen NMRI-Mäusen vom selben Züchter durchgeführt. Die Tiere wurden mindestens 5 Tage vor dem geplanten Versuchsdatum von der Zuchtfarm bezogen. 18 Stunden vor Versuchsbeginn wurde ihnen bei Wasser ad libitum das Futter entzogen. Ihr Nüchterngewicht sollte 25-27g betragen.

4. Methoden

4.1. Analytische Methoden

4.1.1. Dünnschichtchromatographie

Die Aminosäurederivate und Peptide wurden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst, mit Glaskapillaren auf Kieselgelplatten aufgetragen und in Chromatographiekammern mit den folgenden Laufmitteln aufgetrennt:

Laufmittel I : BuOH:HOAc:aqua = 4:1:1
Laufmittel II: BuOH:Pyridin:HOAc:aqua = 30:20:6:24

Die Chromatogramme wurden im Luftstrom getrocknet und mit den folgenden Reagentien angefärbt:

4.1.1.1. Verwendetes Aminosäure- und Peptidnachweisreagenz

0.3% Ninhydrin in BuOH, mit 1% HOAc gelöst. Das Reagenz wird aufgesprüht und die Chromatogramme bei 100*C im Trockenschrank entwickelt.

4.1.1.2. Paulys Reagenz zum Nachweis freier phenolischer Hydroxylgruppen (31)

Das Reagenz wurde hier zum Nachweis der freien Hydroxylgruppe des Tyrosins eingesetzt.

Sprühlösung I : Je 100 ml Bromphenolblau (0,2% in Wasser), Methylrot (0,06% in MeOH) und 1/15 molarer K-Na-Phosphatpuffer (pH 7.2) nach Sörensen werden vereinigt.

Sprühlösung II: (Sulfanilsäure diazotiert); 450 mg Sulfanilsäure wird mit 4,5 ml 12 N HCl angelöst und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Sulfanilsäure löst sich unter Erwärmen vollständig. 10 ml der Lösung kühlt man im Eisbad, fügt langsam 10 ml eiskalte 4,5%-ige wäßrige Natriumnitritlösung zu und versetzt nach 15-minütigem Stehen mit dem gleichen Volumen einer 10%-igen wäßrigen Natriumcarbonatlösung.

Man besprüht das Chromatogramm zuerst mit I, nach kurzem Abläften mit II. Nach wenigen Sekunden erscheint bei vorhandener phenolischer Hydroxylgruppe ein blauer Substanzfleck, der im Gegensatz zum grünen der freien Aminogruppe beständig ist.

4.1.2. Elementaranalyse

5-10 mg Substanz werden im Vakuum der Trockenpistole bei 60°C über KOH/Phosphorpentoxid getrocknet und im Analysator auf CHN-Gehalt überprüft.

4.1.3. Drehwerte

Sie werden im Zeiss-Polarimeter bei 546,1 nm und 577,8 nm mit 1%-igen Lösungen bestimmt (Lösungsmittel: MeOH bzw. DMF).

4.1.4. Schmelzpunkte

Die unkorrigierten Werte werden in der Apparatur nach Dr. Tottoli ermittelt.

4.1.5. Aminosäureanalyse

100-500 ug Substanz wird im Hydrolyserohr mit 1,5 ml 6N HCl versetzt und mit Stickstoff 1 Minute lang begast. Man verschließt das Rohr und erhitzt 24 h bei 110°C im Ölbad. Das Hydrolysat wird im Vakuum über KOH/P_2O_5*). Die Aminosäurezusammensetzung wird im Aminosäureanalysator quantitativ bestimmt.

*) getrocknet

4.1.6. Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie (32,33,34)

Die in 30% MeOH konservierten CA-Folien werden im Elektrophoresepuffer ca. 10-15 min. äquilibriert, überschüßiger Puffer mit Filterpapier abgesaugt und die in Puffer gelösten Substanzen aufgetragen. Man legt die so vorbereiteten Folien auf die Kühlplatte (ca.10°C) der Elektrophoresekammer, stellt mit puffergetränkten Dochten aus Chromatographiepapier elektrischen Kontakt zwischen den beiden Elektrodenkammern über die Folie her und legt für 1 h eine Spannung von 200 V an. Anschließend färbt man 5 min. mit Ponceau S.

Elektrophoresepuffer:
Puffer I : 0,06 M Veronal/Na-Veronal pH 8,8 in 4 M Harnstoff
Puffer II: 2,4 M Ameisensäure in 4 M Harnstoff
Färbelösung: 0,5% Ponceau S in 5% TCA
Entfärber: 5% Essigsäure

4.1.6. Analytische isoelektrische Focusierung (35,36)

Die IEF der dargestellten Insulinderivate wird auf 1 mm-Polyacrylamidgelen (T5C3), pH 2,5-8, in 7 M Harnstoff durchgeführt. Die Gele werden aus folgenden Stammlösungen auf silanisierten 70x125 mm-Glasplatten (36) gegossen:

I : 19,4 g Acrylamid und 0,6 g Bisacrylamid mit aqua bidest. ad 100 ml. Entionisierung mit 2 g Amberlite MB6 (36)

II : 10,14 M Harnstoff = 4,2 g ad 6,9 ml in aqua bidest.

III: 22,6 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml aqua bidest.

2,0 ml Lösung I, 5,52 ml Lösung II und 0,4 ml Ampholytlösung, bestehend aus 0,24 ml Pharmalyte pH 2,5-5 und 0,16 ml Pharmalyte pH 5-8, werden vereinigt und kurz in einer kleinen Saugflasche entgast. Als Starter zur Polymerisation werden 80 ul der Lösung III zugefügt und die sorgfältig vermischte Reaktionslösung in die vorbereitete Gelgießform rasch blasenfrei eingefüllt. Nach 1 h Polymerisation löst man das Gel aus der Form und führt anschließend eine Präfocusierung zum Aufbau des pH-Gradienten durch. Die Proben werden in 7 M Harnstoff mit 1% Ampholyten (pH 5-8) gelöst und mit 5x10 mm-Filterpapierschnipseln aufgetragen. Zur Kontrolle wird eine Eichproteinmischung parallel mitaufgetrennt. Die IEF wird nach ca. 2000 Vh Spannungsfluß beendet. Man fixiert mit 3,5% Sulfosalicylsäure/11,5% TCA über 1 h und betrachtet das Trennergebnis gegen einen schwarzen Untergrund. Die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 gelingt nur mit sehr hohen Insulinprobemengen, da es im Färbe- und anschließend im Entfärbemedium (8% HOAc, 25% EtOH in Wasser) aus dem Gel leicht wieder herausgelöst wird.

4.2. Präparative Methoden

4.2.1. Darstellung von di-Boc-Desoctapeptidinsulin und di-Boc-Desoctapeptidinsulinpentamethylester

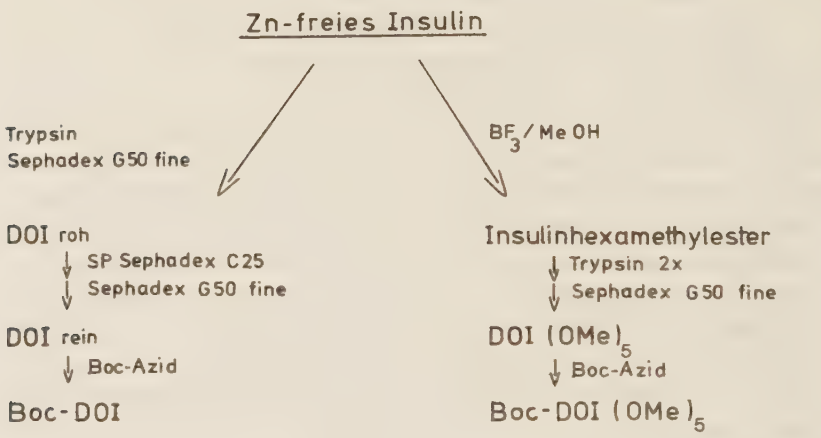

Abb.2: Syntheseschema von di-Boc-DOI und di-Boc-DOI(OMe)

4.2.1.1. Zinkfreies Insulin (37)

500 mg kristallines Rinderinsulin, das als Zn-Komplex vorliegt, werden in 10 ml Wasser und 5 ml 0,1 N HCl gelöst, mit 100 mg EDTA-di-Natriumsalz kurz verrührt, mit 1 N NaOH bei pH 5,4 isoelektrisch gefällt und abzentrifugiert. Den Niederschlag löst man in 5 ml 1 N HOAc und trennt über eine Sephadex G50 fine-Säule (4x135 cm). Die Hauptfraktion wird lyophilisiert. Ausbeute: 430-460 mg (86-92% d.Th.)

Zn-Gehalt: 0,011% (flammenphotometr.)
(0,25-0,3% f. krist. Insulin)

4.2.1.2. Desoctapeptidinsulin (3)

500 mg Zn-freies Insulin werden in 100 ml Wasser gelöst, die Lösung mit 0,1 N NaOH auf pH 9,4 eingestellt und mit 12,5 ml 2 mM Calciumchlorid-Lösung von pH 9,4, die 25 mg Trypsin enthält, versetzt. Man hält den pH-Wert mit 0,1 N NaOH über drei Stunden am pH-Meter konstant. Anschließend fällt man das freigesetzte DOI mit 1 N HCl am IP bei pH 4,8. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in 5 ml 1N HOAc gelöst und wie unter 4.2.1.2 gelchromatographisch gereinigt. Das so von mitgerissenem Trypsin, bei der enzymatischen Verdauung entstandenen Polymeren, dem abgespaltenen Octa- bzw. Heptapeptid und Alanin-B30 getrennte Produkt wird lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 250 mg DOI (60% d.Th.)

4.2.1.2.1. Reinigung an SP-Sephadex C25 (38)

Das Produkt der tryptischen Spaltung enthält auch nach der gelchromatograhischen Reinigung noch Spuren unverdauten Insulins bzw. Des-Ala-B30-Insulins. Diese werden nach Cui et al. (38) über eine SP-Sephadex C25-Säule (2x35 cm) entfernt:
100 mg DOI werden in 10 ml Laufmittel, bestehend aus 9% HOAc, 40% Isopropanol und 51% Wasser, mit Ammoniak auf pH 3,0 eingestellt, auf die Säule gebracht und mit 1000 ml eines Gradienten von 0-0,2 M NaCl in Laufmittel eluiert. Die Fraktionen des Hauptpeaks werden gesammelt, Isopropanol im Vakuum entfernt, über Sephadex G50 fine nach 4.2.1.1 entsalzt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 45-55 mg DOI (45-55% d-Th.)

Aminosäureanalyse siehe 5.x.x.x.

4.2.1.3. Insulinhexamethylester (39)

500 mg Zn-freies Insulin werden nach Gattner et al. (39) in 50 ml abs. MeOH mit 2,5 ml Bortrifluorid (14%(w/v) in MeOH) gelöst und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene

Insulinhexamethylester wird mit 500 ml trockenem Äther gefällt, abzentrifugiert, wiederholt mit Äther gewaschen und im Vakuum über KOH/P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: ca. 500 mg $I(OMe)_6$; Methoxyl'gehalt*) (nach Zeisel): ber.: 3,04%; gef.: 3,05-3,11%

4.2.1.4. Desoctapeptidinsulinpentamethylester (5)

500 mg $I(OMe)_6$ werden wie unter 4.2.1.3 gelöst und mit Trypsin bei pH 7,9 verdaut. Da der enzymatisch freigesetzte $DOI(OMe)_5$ ob seines nahen IP von pH 8,4 während der Verdauung ausfällt und unverdautes Ausgangsprodukt mitreißt, löst man stündlich mit 1 N HCl bei pH 5,0 und stellt mit 0,1 N NaOH vorsichtig wieder auf pH 7,9 ein. Nach 5-6 h fällt man das entstandene $DOI(OMe)_5$ mit 0,1 N NaOH am IP, pH 8,4, zentifugiert und trennt den in 5 ml 1 N HOAc gelösten Niederschlag nach 4.2.1.1. über Sephadex G50 fine. Man erhält 300-330 mg $DOI(OMe)_5$, das noch ca. 15-20% ungespaltenen $I(OMe)_6$ enthält. Um reinen $DOI(OMe)_5$ zu erhalten, wiederholt man die tryptische Spaltung und reinigt das Endprodukt durch mehrmaliges Rechromatographieren (5) über eine Sephadex G50 fine-Säule (3x180 cm) in 1 N HOAc. Ausbeute: 100-125 mg $DOI(OMe)_5$ (4x Rechromatographie)

4.2.1.5. Bocylierung von DOI und $DOI(OMe)_5$ (5,40)

100 mg gereinigtes DOI bzw. $DOI(OMe)_5$ werden in 16 ml DMF gelöst, mit 280 ul 1 N TEA in DMF versetzt und nach Zugabe von 0,75 ml Boc-Azid (1040 mg) 5 h lang bei 40°C gerührt. Man beendet die Reaktion durch Hinzufügen von 0,5 ml Eisessig und kühlt im Eisbad. Die bocylierten Produkte werden mit 200 ml eiskaltem Äther gefällt, abzentrifugiert, dreimal mit Äther gewaschen und im Vakuum über KOH/P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 90-95 mg di-Boc-DOI bzw. di-Boc-$DOI(OMe)_5$ 89-94% d.Th.)

*) Methoxyl- = Kurzform f. Methylester

4.2.2. Peptidsynthesen

4.2.2.1. Darstellung der geschützten Aminosäuren

Die Herstellung der N-t.-Boc-geschützten Aminosäuren erfolgt nach der Schnabel-Methode am pH-Stat (41). Alaninmethylesterhydrochlorid wird nach Weber (42) erzeugt. Die Hydrochloride der Methylester von Glycin und Phenylalanin werden mit Thionylchlorid in abs. Methanol synthetisiert (43).

4.2.2.2. Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der Peptide (5,44)

Die Peptide werden klassisch nach der Methode von König & Geiger (44) aufgebaut:

50 mmol Aminosäure- bzw. Peptidmethylester-Hydrochlorid werden in DMF gelöst, mit 50 mmol TEA 15 min. bei Raumtemperatur gerührt, anschließend vom ausgefallenen Triäthylammonium-Hydrochlorid abgetrennt und mit 50 mmol N-t.-Boc-geschützter Carboxylkomponente versetzt. Es wird gerade soviel Lösungsmittel eingesetzt, daß die Konzentration der Reaktionspartner 0,5-1 mol/l beträgt. Nun fügt man 50 bzw. 100 mmol HOBt zu und kühlt die klare Lösung unter 0°C ab. Unter stetigem Rühren und Kühlen tropft man 50 mmol DCC in wenig DMF zu. Nach 2-3 h entfernt man die Kühlung, läßt die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt über Nacht weiter. Nach Reaktionsende filtriert man vom ausgefallenen Dicyclohexyl(DC)-Harnstoff ab und rührt das klare Filtrat in eiskalte halbgesättigte Kochsalzlösung.

Die öligen Präzipitate der Di- und Tripeptide extrahiert man erschöpfend mit Ethylacetat. Man wäscht die vereinigten Extrakte mit 5% Natriumbicarbonat-, 5% Kaliumbisulfat-, halbkonz. Kochsalzlösung und trocknet über wasserfreiem Magnesiumsulfat. Dann zieht man das Lösungsmittel im Vakuum ab und kristallisiert aus einem geeigneten Medium.

Die festen Präzipitate der Pentapeptide werden dagegen abgesaugt, in DMF gelöst, mit den genannten Waschlösungen wiederholt gefällt und abgesaugt, abschließend mit aqua dest. neutral gewaschen und über dem üblichen Trockenmittel im Vakuum getrocknet. Mitgerissener DC-Harnstoff wird durch Auskochen mit abs. MeOH entfernt.

4.2.2.3. Entfernung der O-Benzyl- und Boc-Schutzgruppen

4.2.2.3.1. Katalytische Hydrierung der O-Benzylgruppe (45)

100-500 mg O-Benzyl-geschütztes Peptid werden in 50-100 ml MeOH/HOAc (1:1) in der Hydrierbirne gelöst, mit Palladium-Aktivkohle versetzt, entgast und bei ca. 3 bar Wasserstoff-Druck 5-6 h hydriert. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle zieht man das Lösungsmittelgemisch ab und kristallisiert aus einem geeigneten Medium. Die hydrierten Peptide reagieren in der Dünnschichtchromatographie Pauly-positiv.

4.2.2.3.2. Abspaltung der Boc-Gruppe (46)

Das Boc-geschützte Peptid wird mit 1 N HCl/Eisessig in 2-3-fachem molarem Überschuß gelöst und 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend entfernt man die HCL/Essigsäure durch mehrmaliges Abrotieren mit abs. EtOH und kristallisiert aus einem geeigneten Lösungsmittel unter Zugabe von Äther.

4.2.3. Methoden zur Semisynthese der Destripeptidinsuline

4.2.3.1. Chemische Kupplung (5,47)

5 umol di-Boc-DOI$(OMe)_5$ (25 mg) werden in einem 30 ml-Zentrifugenglas (mit Schliff) fein verrieben, in 2 ml Pyridin suspendiert, das anzukuppelnde Pentapeptidmethylester-Hydrochlorid in dreifachem Überschuß zugegeben und bis zur vollständigen Lösung der Komponenten gerührt. Ist das Pentapeptid schwer löslich, so löst man es in 200-300 ul DMF, fügt anschließend di-Boc-DOI$(OMe)_5$ zu und füllt mit Pyridin auf 2 ml Lösungsmittelvolumen auf. Die klare Lösung kühlt man auf Eis-Kochsalz unter -15°C ab und fügt 100 ul 0,1 N HNSu in Pyridin zu. Die Kupplungsreaktion wird nach einigen Minuten unter langsamer Zugabe von 100 ul 0,1 N DCC in Pyridin gestartet. Man läßt 4-5 h in der Kälte und weitere 44 h bei Raumtemperatur rühren, beendet die Reaktion durch Zugabe von 20 ml eiskalten Äthers und zentrifugiert 1 min. bei 2000g. Der Niederschlag wird mehrfach mit Äther gewaschen und abschließend im Vakuum über KOH/P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: ca. 22-25 mg

4.2.3.1.1. Entfernung der Boc-Gruppen der Insulinderivate(40)

Die N-t.-Boc-Schutzgruppen der gekuppelten Derivate werden nach Levy & Carpenter (40) abgespaltet: Ca. 25 mg di-Boc-Insulinderivat werden mit 1 ml TFA 2 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 15 ml eiskaltem Äther gefällt, abzentrifugiert und dreimal mit Äther gewaschen. Das Präzipitat wird im Vakuum über KOH/P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: ca. 20-24 mg

4.2.3.1.2. Verseifung der Methylester-Gruppen der Insulinderivate (48,49)

Je 5 mg debocyliertes Kupplungsprodukt werden in 1ml eiskalter 0,1 N NaOH aufgenommen und über 45 min. bei 10°C verseift. Dann fällt man das hydrolysierte Produkt unter Zugabe von 1 N HCl an seinem erwarteten IP zwischen pH 4,5 und 5,0, läßt einige Minuten in der Kälte stehen und zentrifugiert ab. Im Niederschlag sind keine Methoxylgruppen mehr nachzuweisen.

4.2.3.1.3. Reinigung des verseiften Rohprodukts (5,47)

Der Niederschlag der IP-Fällung nach Hydrolyse der Methylestergruppen wird, in wenig Laufmittel gelöst, über Sephadex G50 fine-Säulen von Nebenprodukten und mitgerissenem Pentapeptid befreit. Laufmittel und Säulendimensionen sind unter den Synthesebeschreibungen der einzelnen Derivate aufgeführt. Die Fraktionen der Kupplungsprodukte werden gesammelt und gefriergetrocknet. Ausbeute: ca. 5-10 mg

4.2.3.2. Enzymatische Semisynthese (19,21)

4.2.3.2.1. Trypsin-katalysierte Kupplungsreaktion (19,21)

10 umol di-Boc-DOI (50 mg) und 100 umol Pentapeptidmethylester-hydrochlorid werden in 0,75 ml DMF/BD/H_2O (35:35:30), das 0,125 mol/l Tris-Acetat enthält, gelöst, 5 mg Trypsin zugegeben und der pH-Wert an der Mikroelektrode vorsichtig mit Eisessig auf pH 6,5 eingestellt. Man inkubiert die Lösung 24 Stunden bei 37°C auf dem Schüttelbad, unterbrochen durch Gaben von je 2,5 mg Trypsin nach 8 und 16 h. Zur Beendigung der Reaktion säuert man die trübe gewordene Lösung mit 0,5 ml Essigsäure und verdünnt mit 2 ml bidest. Wasser.

4.2.3.2.2. Gelchromatographische Auftrennung und Debocylierung (40) des Rohprodukts

Die verdünnte essigsaure Lösung der Reaktionsmischung trägt man auf eine Sephadex G50 fine-Säule (2,6x70 cm) auf und eluiert mit 3 N Essigsäure. Die Fraktionen des Rohprodukts werden gesammelt und lyophilisiert. Ausbeute: ca. 40-45 mg

Das Rohprodukt wird nach 4.2.3.1.1 debocyliert (40) und aufgearbeitet. Zur weiteren Reinigung nimmt man es in 0,5 ml 0,2 N HOAc auf, trennt es über eine Sephadex G50 fine-Säule (1,2x42 cm) in 0,2 N HOAc von geringen Mengen entstandener Polymeren und lyophilisiert. Ausbeute: ca. 25-35 mg

4.2.3.2.3. Reinigung über DEAE-Sephadex A25 (38) und Entsalzung über Sephadex G50 fine

Das debocylierte Rohprodukt, das als variierter Destripeptidinsulin-B27-Methylester vorliegt, wird nach Cui et al.(38) über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A25 von ungekuppeltem DOI getrennt. Man löst das Lyophilisat in Startpuffer (0,05 mol/l Tris-HCl, 40% Isopropanol , pH 7,5) und trägt es auf die in Startpuffer äquilibrierte Säule (1x 20 cm) auf. Es wird mit einem linearen Gradienten aus 120 ml Startpuffer und 120 ml 0,15 molarer NaCl in Startpuffer eluiert. Die gesammelten Fraktionen des Kupplungsprodukt-B27-Methylesters werden im Vakuum vom Isopropanol befreit, auf 1-2 ml Volumen eingeengt und mit wenig Eisessig angesäuert,so daß sich das ausfallende Produkt gerade wieder vollständig löst. Diese Lösung trägt man auf eine Sephadex G50 fine-Säule (1,5x95 cm) und eluiert mit 0,2 N HOAc. Die gereinigten Fraktionen des Kupplungsprodukts werden gesammelt und lyophilisiert. Ausbeute: ca. 8-15 mg

4.2.3.2.4. Verseifung des Ala-B27-Methylesters (48,49) und Reinigung über Sephadex G50 fine

Der C-terminale B27-Methylester des Kupplungsprodukts wird, wie unter 4.2.3.1.2. beschrieben, verseift, das freie Produkt an seinem isoelektrischen Punkt zwischen pH 4,5 und 5,0 mit 1 N HCl gefällt und nach kurzem Stehen in der Kälte abzentrifugiert. Der Niederschlag wird in 0,5 ml 0,2 N HOAc aufgenommen, wie unter 4.2.3.1.3 beschrieben, über Sephadex G50 fine getrennt und das gereinigte Endprodukt gefriergetrocknet.

Ausbeute: ca. 3-10 mg

4.3. Biologische Tests

4.3.1. Bestimmung der biologischen Eigenschaften der dargestellten Insulinderivate in vitro

4.3.1.1. Glucoseoxidation epididymaler Fettzellen unter Einfluß von Insulin (50,51)

4.3.1.1.1. Präparation der Fettzellen (50)

3-5 ca. 120-180 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten werden durch Genickschlag getötet, decapitiert und das Fettgewebe der Nebenhoden entnommen. Man erhält ca. 1,5-2 g Gewebe, das man zur Freisetzung der Fettzellen in Anlehnung an die Vorschrift von Rodbell (50), modifiziert nach Heptner & Christ (52), unter Albuminzusatz (53) mit Rohkollagenase verdaut:

1,5-2 g Fettgewebe wird in 3 ml Tris-Puffer I (pH 7,8), der 2,4 g Tris (20 mmol), 5,1 g NaCl (87 mmol), 1,9 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ (8,5 mmol), 0,1 g Glucose und 35 g Rinderalbumin (3,5%) pro Liter enthält (der pH wird mit konz. HCl eingestellt), mit 7-9 mg Kollagenase behandelt. Die Gewebesuspension wird 1 min mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% CO_2) begast und im verschloßenen 30 ml-PU-Röhrchen 1 h bei 37*C mit mäßiger Frequenz (ca. 60 rpm) im Schüttelbad inkubiert. Anschließend gießt man das desintegrierte Gewebe durch ein Nylonnetz in ein Zentrifugenglas und zentrifugiert ca. 15 sec. bei 50-70 g. Die Phase unter der oben schwimmenden Zellschicht wird durch einen dünnen Silikonschlauch abgesaugt und die Zellen viermal mit Tris-Puffer II, der i. Ggs. zum Tris-Puffer I auf pH 7,2 eingestellt ist und 3,5 g NaCl (60 mmol) und 20 g Rinderalbumin (2%) je Liter bei sonst gleicher Zusammensetzung enthält, gewaschen und zentrifugiert. Abschließend suspendiert man die gereinigten Zellen in 35 ml Tris-Puffer II und bestimmt die Zelldichte der Suspension in der Neugebauer-Kammer.

4.3.1.1.2. Messung des in der Glucoseoxidation freigesetzten $^{14}CO_2$

Das in der Glucoseoxidation der Fettzelle aus 1-14C-D-Glucose freigesetzte CO_2 wird ermittelt. Dazu wird 1 uCi 1-14C-D-Glucose in 32 ml Tris-Puffer II gelöst und in Aliquots auf Inkubationsröhrchen verteilt. Man fügt die in Tris II gelöste Prüfsubstanz, Zellsuspension (4.3.1.1.1.) und Natriumbicarbonat-Lösung (2,112 g/100 ml) zum Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,4 zu und schüttelt die verschlossenen Röhrchen 2 h bei 37°C im Schüttelbad (ca. 30 rpm). In jedem Test werden zur Standardisierung Leerwertproben und Proben einer Rinderinsulinkonzentration, die maximale CO_2-Produktion bewirkt, mitgetestet.

Inkubationsansatz in Pipettierreihenfolge:

0,2 ml Testsubstanz bzw. Rinderinsulinstandard (500 ng/ml) in Tris II oder 0,2 ml Tris II (Leerwert)
1,1 ml 1-14C-Glucose (31,25 uCi) in Tris II
1,0 ml Zellsuspension (4.3.1.1.1.)
0,2 ml $NaHCO_3$-Lösung (21,12 g/l)

Konzentration der Puffersubstanzen im Test:

Tris	18,4 mmol/l	1-14C-D-Glucose	13,75 uCi/l
K_2HPO_4	7,82 mmol/l	Rinderalbumin	19,4 g/l
NaCl	55,1 mmol/l		
$NaHCO_3$	20,1 mmol/l		
Glucose	51,1 umol/l		

Zur Inkubation werden Polystyrol-Röhrchen verwendet, die man mit Gummistopfen, an deren Unterseite 1 ml-Plastikcups zur Aufnahme von Hyamine in eine Drahtöse einhängt werden, verschließt. Mittels einer Injektionsspritze können so bei verschlossenem Gefäß Reagenzien ohne Gasverluste zugegeben werden. Am Ende der zweistündigen Inkubation füllt man die frei hängenden Cups mit 0,4 ml Hyamine-Lösung (1 mol/l in MeOH)

und treibt das entstandene CO_2 mit 0,2 ml 10%iger Schwefelsäure aus dem Medium aus. Zur Absorption des radioaktiven und des nicht markierten CO_2 im Hyamine schüttelt man weitere 90-120 min. bei 37°C im Schüttelbad. Danach überführt man die Hyamine-Cups in mit 10 ml Szintillatorgemisch (5 g PPO, 0,1 g POPOP/l Toluol) gefüllte Szintillationsgefäße und zählt die freigesetzte Radioaktivität über je 10 min. im Szintillationsspektrometer.

Die vom Insulin beeinflußte Stoffwechselaktivität der Fettzellen entspricht der $^{14}CO_2$ -Freisetzung aus dem Abbau der 1-14C-D-Glucose. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der dargestellten Insulinderivate stellt man Verdünnungsreihen von diesen her. Man ermittelt durch Stichtests ihren Wirkungsbereich und erstellt dann Dosis-Wirkungskurven zwischen minimaler Leerwert- und maximaler Stimulierung bei hohen Konzentrationen, die der maximalen durch den Insulinstandard induzierten Stimulierung vergleichbar ist.

Im Test werden von jeder Substanzkonzentration Vierfachbestimmungen gemacht. Die erhaltenen absoluten Stimulierungswerte werden mit der jeweiligen Maximalstimulierung des Insulinstandards verglichen und so die relative Stimulierung in Prozent der Maximalstimulierung erhalten.

Jede Substanz wird in mindestens dreimal mit denselben Konzentrationen getestet und die einzeln erhaltenen relativen Dosis-Wirkungskurven statistisch gemittelt.

Als Maß der biologischen Aktivität eines Insulinderivats dient der graphisch ermittelte Wert der halbmaximalen Stimulierung auf der Dosis-Wirkungskurve zwischen Leerwert und Maximalstimulierung, der in Bezug zur halbmaximalem Stimulierung der Dosis-Wirkungs-Eichkurve der Rinderinsulins gesetzt und in "Prozent Insulinwirkung" angegeben wird.

4.3.1.2. Insulin-Rezeptor-Bindungstest (54-56)

Die Bindungseigenschaften der enzymatisch synthetisierten Insulinderivate werden im Rezeptorbindungstest an Rattenle-

ber-Plasmamembranen ermittelt. Die Plasmamembranen werden mit der nach Fleischer & Kervina (57) modifizierten Methode von Stein et al. (58) isoliert und mit 125J-Rinderinsulin (59,60) inkubiert. Man bestimmt die konzentrationsabhängige Verdrängung des 125J-Insulins durch die verschiedenen Insulinderivate nach Cuatrecasas (54) in der Modifikation von Koch (55).

Die erhaltenen dosisabhängigen Verdrängungskurven, die man aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung in Gegenwart von 33 ug/ml nativem Insulin als spezifische Bindung ermittelt, werden auf 100% 125J-Insulinbindung für den Leerwert und 0% Bindung für die Maximalverdrängung, die mit der unspezifischen Bindung identisch ist, normalisiert. Die relativen Bindungseigenschaften der semisynthetischen Insulinvarianten werden im Vergleich mit der Rinderinsulin-Verdrängungskurve analog zur biologischen Aktivität in der Glucoseoxidation errechnet und in Prozentualwerten angegeben.

Diese Untersuchungen wurden ebenso wie die im folgenden Abschnitt beschriebenen Radioimmunoassays von Herrn Dipl.-Biochem. Arno Deger vorgenommen. Dafür danke ich ihm an dieser Stelle nochmals sehr herzlich.

4.3.1.3. Bestimmung der antigenen Eigenschaften im Radioimmunoassay (61)

Die antigenen Eigenschaften der enzymatisch-semisynthetisch dargestellten Derivate werden im Radioimmunoassay nach Desbuquois & Aurbach (61) bestimmt. An Meerschweinchen-Antikörpern gegen Schweineinsulin ermittelt man mit 125J-Schweineinsulin dosisabhängige Verdrängungskurven der dargestellten Insuline, die mit der Rinderinsulin-Eichkurve verglichen werden.

4.3.2. Bestimmung der biologischen Aktivität in vivo (62-66)

Als Parameter der Insulinaktivität in vivo werden blutzuckersenkenden Eigenschaften der Insulin-Analoga und die insulinabhängige Aufnahme radioaktiv markierter U-14C-Glucose in Zwerchfell und epididymales Fettgewebe an der Maus bestimmt. Dazu injiziert man in Anlehnung an Rafaelsen (62) und andere Autoren (63-66) männlichen NMRI-Mäusen intraperitoneal insulinwirksame Testsubstanz gemeinsam mit U-14C-Glucose:

4.3.2.1. Behandlung der Tiere

18 Stunden vor dem geplanten Vesuchsbeginn entzieht man einer Gruppe von 21 Mäusemännchen das Futter bei Wasser ad libitum. Den nüchtern 25-27 g schweren Tieren injiziert man in 3-min.-Abständen intraperitoneal 0,3 ml Ringer-Lösung, die 0,3 uCi U-14C-Glucose und Testsubstanz in definierter Konzentration enthält. Man setzt, abhängig von der In vitro-Aktivität der Substanz, 0,5-50 ug Insulinderivat pro Tier ein. Je Versuch werden mit jeder Substanzkonzentration 3 Tiere getestet. Als Kontrollgruppe erhalten 3 Tiere nur U-14C-Glucose in Ringerlösung, zur Standardisierung 3 Mäuse je 2 ug Rinderinsulin mit U-14C-Glucose in Ringerlösung. Jeder Versuch wird mindestens einmal wiederholt.

60 min. nach der Injektion decapitiert man die Tiere und entnimmt zur Blutzuckerbestimmung Blut. 0,1 ml dieses "ganz besonderen Saftes" (67) werden mit 1 ml 0,33 N Perchlorsäure enteiweißt und die Blutglucose nach 4.3.2.2. bestimmt. Dem ausgebluteten Tier eröffnet man die Bauchhöhle, präpariert das Zwerchfell, das sorgfältig von anhaftender Peritonealflüssigkeit befreit wird und den Nebenhodenfettkörper kontralateral vom Injektionsort heraus und überführt die Gewebe in 25 ml-Szintillationsfläschchen, die vorher gewogen worden sind.

4.3.2.2. Blutzuckerbestimmung

Die in Eppendorfcups enteiweißten Blutproben (4.3.2.1.) werden zentrifugiert, aus dem Überstand 0,1 ml entnommen und mit 5 ml GOD-Reagenz der Fa. Boehringer/Mannheim der Blutglucose-Gehalt gegen den Boehringer-Glucosestandard bestimmt.

4.3.2.3. Zersetzung des entnommenen Gewebes und Bestimmung der aufgenommenen 14C-Glucose

Zur Einwaagebestimmung werden die Szintillationsgefäße mit den Proben gewogen. Anschließend zersetzt man die Proben mit 0,5 ml Oxidationsgemisch (33 ml 70% Perchlorsäure, 67 ml 30% H_2O_2) im verschlossenen Gefäß 1 Stunde bei 85*C auf dem Wasserbad. Nach dem Abkühlen füllt man jedes Gefäß mit 10 ml Szintillator (6 g PPO, 1 l Toluol, 11 Cellosolve) auf und zählt die Zerfälle der eingebauten U-14C-Glucose im Szintillationsspektrometer. Die gemessene Aktivität wird auf die Gewebseinwaage umgerechnet und in Zerfällen/Gramm angegeben.

Zur vergleichenden Beurteilung der Ergebnisse berechnet man die statistischen Mittelwerte, normiert auf den Insulinstandard und stellt die prozentualen Werte einer Insulineichreihe gegenüber.

5. Ergebnisse

5.1. Synthese der Pentapeptide

5.1.1. Synthesestrategie

Die anzukuppelnden Pentapeptide wurden zur Variation der Insulinsequenz B24-27 aus Dipeptiden für die Positionen B23-24 24 und Tripeptiden für die Positionen B25-27 aufgebaut. Die Synthese der Di- und Tripeptide und die Kondensation dieser Fragmente erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4.2.2.2.

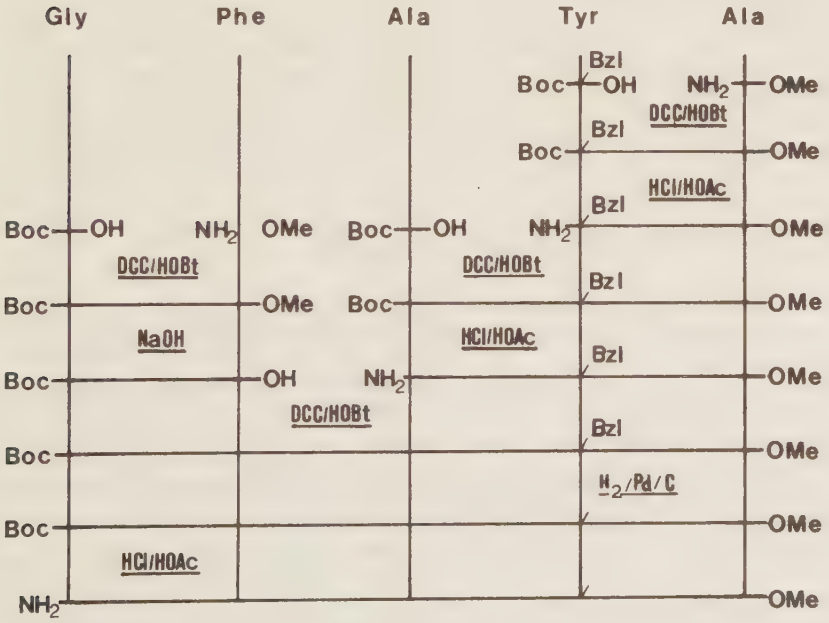

Abb. 3: Syntheseschema der dargestellten Pentapeptide am Beispiel der Sequenz Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala

Die Pentapeptide wurden erst kurz vor dem Einsatz in der Semisynthese aus ihrer lagerfähigen geschützten Form freigesetzt. Die einzelnen Schritte der Abspaltung der Schutzgruppen - katalytische Hydrierung (45) und Debocylierung (46) - wurden dünnschichtchromatographisch durch differentielle Anfärbung mit Paulys Reagenz und Ninhydrin kontrolliert.

5.1.2. Synthese der Dipeptide B23-24

5.1.2.1. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanin

5.1.2.1.1. t.-Boc-Glycyl-Phenylalaninmethylester

Die Synthese wurde nach Eisele (68) durchgeführt. 100 mmol Phe-OMexHCl (21,56 g) wurden mit 100 mmol Boc-Gly (17,5 g) und 100 mmol DCC (20,6 g) in Dichlormethan unter Zusatz von 100 mmol TEA (14 ml) nach der allgemeinen Vorschrift 4.2.2.2. umgesetzt. Da das Produkt schlecht kristallisierte, wurde es als Öl weiterverarbeitet. Ausbeute: 28,1 g Öl (ca.83% d.Th)

$C_{17}H_{24}N_2O_5$ (337,39) Rf (I) 0,92 Rf (II) 0,87

5.1.2.1.2. Verseifung des Methylesters

83 mmol Boc-Gly-Phe-OMe (28,1 g Öl) wurden in 120 ml Dioxan nach Zugabe von 44 ml 2 N NaOH zwei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Dioxan im Vakuum abgezogen, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure angesäuert und das sich abscheidende Öl erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und aus Äther/Petroläther kristallisiert (Lange weiße Nadeln).

Fp.: 143-144°C Ausbeute: 19,8 g (74% d.Th.)

$C_{16}H_{22}N_2O_5$ (322,34) Rf (I) 0,85 Rf (II) 0,78

a(546): + 34,0°; a(578): + 30,0° (c=1, MeOH)

5.1.2.2. t.-Boc-Glycyl-Alanin

5.1.2.2.1. t.-Boc-Glycyl-Alaninmethylester

100 mmol Ala-OMexHCl (13,96 g) wurden mit 100 mmol Boc-Gly (17,5 g) in Dichlormethan nach 5.1.2.1.1 umgesetzt. Da das Produkt äußerst schlecht kristallisierte, wurde es als Öl weiterverarbeitet. Ausbeute: 21,3 g Öl (ca.82% d.Th.)

$C_{11}H_{20}N_2O_5$ (261,29) Rf (I) 0,8 Rf (II) 0,78

5.1.2.2.2. Verseifung des Methylesters

Ca. 50 mmol Boc-Gly-Ala-OMe (13 g Öl) wurden in 80 ml Dioxan nach Zugabe von 27 ml 2 N NaOH 2 Stunden bei Raumtemperatur verseift. Anschließend wurde nach 5.1.2.1.2. aufgearbeitet und aus Ethylacetat/Petroläther kristallisiert.
Fp.: 129-130°C Zers. Ausbeute: 8,35 g (68% d.Th.)

$C_{10}H_{18}N_2O_5$ (246,26) Rf (I) 0,73 Rf (II) 0,65

a(546): - 20,5°; a(578): - 18,0° (c=1, MeOH)

5.1.2.3. t.-Boc-Glycyl-Glycin

5.1.2.3.1. t.-Boc-Glycyl-Glycinmethylester

100 mmol Gly-OMexHCl (12,55 g) wurden mit 100 mmol Boc-Gly (17,5 g) nach 5.1.2.1.1 in Dichlormethan umgesetzt und aufgearbeitet. Das Produkt wurde als Öl weiterverarbeitet.
Ausbeute: 13,8 g Öl (57% d.Th.)

$C_{10}H_{18}N_2O_5$ (246,26) Rf (I) 0,78 Rf (II) 0,78

5.1.2.3.2. Verseifung des Methylesters

37 mmol Boc-Gly-Gly-OMe (13,8 g Öl) wurden in 90 ml Aceton mit 30 ml 2 N NaOH zwei Stunden bei Raumtemperatur verseift und nach 5.1.2.1.2 aufgearbeitet. Das Peptid wurde aus Ethylacetat/Petroläther kristallisiert.

Fp.: 136-137°C Zers. Ausbeute: 7,19 g (85% d.Th.)

$C_9H_{16}N_2O_5$ (231,22) Rf (I) 0,69 Rf (II) 0,6

5.1.3. Synthese der Tripeptide

Die Synthesen von Boc-Tyr(Bzl)-Ala-OMe und Tyr(Bzl)-Ala-OMe xHCl erfolgten nach Weitzel et al. (5). Boc-Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMe und Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl wurden nach (45) bzw. (68) dargestellt.

5.1.3.1. Alanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

5.1.3.1.1. t.-Boc-Alanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

10 mmol Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl(5) (3,93 g) wurden mit 10 mmol Boc-Ala (1,89 g) nach der allgemeinen Vorschrift 4.2.2.2. in DMF gekuppelt. Die Kristallisation erfolgte aus Ethylacetat/Petroläther. Fp.: 151-152°C Ausbeute: 3.84 g (71% d.Th.)

$C_{28}H_{37}N_3O_7$ (527,61) Rf (I) 0,89 Rf (II) 0,91

a(546): - 46,0°; a(578): - 31,5° (c=1, MeOH)

5.1.3.1.2. Debocylierung des Kupplungsproduktes

5 mmol Boc-Ala-Tyr(Bzl)Ala-OMe (2,67 g) wurden in 15 ml 1N HCl/HOAc nach 4.2.2.3.2 debocyliert und aus Methanol/Äther

kristallisiert. Fp.: 200-202°C Ausbeute: 2,26 g (95% d.Th.)
$C_{23}H_{30}N_3O_5Cl$ (463,97) Rf (I) 0,58 Rf (II) 0,69

a(546): + 10,0°; a(578): + 8,5° (c=1, MeOH)

5.1.3.2. Glycyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

5.1.3.2.1. t.-Boc-Glycyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

15 mmol Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (5,26 g) und 15 mmol Boc-Gly (2,63 g) wurden nach 4.2.2.2. mit DCC in DMF umgesetzt. Die Kristallisation erfolgte aus Ethylacetat/Petroläther.
Fp.: 122-124°C Ausbeute: 6,04 g (77% d.Th.)
$C_{27}H_{45}N_3O_7$ (513,58) Rf (I) 0,84 Rf(II) 0,85

a(546): - 12,5°; a(578): - 12,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.2.2. Debocylierung des Kupplungsproduktes

10 mmol Boc-Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMe (5,26 g) wurden mit 30 ml 1 N HCl/HOAc nach 4.2.2.3.2. behandelt. Das debocylierte Peptid kristallisierte aus Methanol/Äther.
Fp. 173-174°C Ausbeute: 4,11 g (89% d.Th.)
$C_{22}H_{28}N_3O_5Cl$ (449,93) Rf (I) 0,49 Rf (II) 0,55

a(546): - 9,0°; a(578): - 6,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.3. Phenylalanyl-Alanyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

5.1.3.3.1. t.-Boc-Alanyl-Alaninmethylester

100 mmol Ala-OMexHCl (13,96 g) und 100 mmol Boc-Ala (18,92g) wurden nach 5.1.2.1.1. mit 100 mmol HOBt (13,5 g) in Dichlor-

methan umgesetzt. Das Peptid wurde aus Äther/Petroläther kristallisiert. Fp.: 107-108°C Ausbeute: 20,26 g (74% d.Th.)
$C_{12}H_{22}N_2O_5$ (274,31) Rf (I) 0,68 Rf (II) 0,8

a(546): - 71,0°; a(578): - 63,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.3.2. Alanyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

70 mmol Boc-Ala-Ala-OMe (19,3 g) wurden nach 4.2.2.3.2. mit 140 ml 1 N HCL/HOAc debocyliert. Der ölige Rückstand wurde aus Trichlormethan/Äther kristallisiert (hygroskopische, zerfließliche Kristalle). Ausbeute: 12,96 g (88% d.Th.)
$C_7H_{15}N_2O_3Cl$ (210,66) Rf (I) 0,49 Rf (II) 0,65

5.1.3.3.3. t.-Boc-Phenylalanyl-Alanyl-Alaninmethylester

15 mmol Ala-Ala-OMexHCl (3,16 g) wurden nach 4.2.2.2. mit 15 mmol Boc-Phe (3,98 g) in lyDMF umgesetzt und aufgearbeitet. Das Peptid kristallisierte aus Ethylacetat/Petroläther.
Fp.: 163-164°C Ausbeute: 3,75 g (59% d.Th.)
$C_{21}H_{31}N_3O_6$ (421,49) Rf (I) 0,82 Rf(II) 0,85

a(546): - 49,0°; a(578): - 43,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.3.4. Debocylierung des geschützten Tripeptids

8 mmol Boc-Phe-Ala-Ala-OMe (3,37 g) wurden nach 4.2.2.3.2. in 14 ml 1N HCl/HOAc debocyliert. Es wurde aus Trichlormethan/Äther kristallisiert (hygroskopische Kristalle).
Fp.: 167-168°C Ausbeute: 2,73 g (95% d.Th.)
$C_{16}H_{27}N_3O_4Cl$ (357,83) Rf (I) 0,55 Rf (II) 0,7

a(546): - 39,0°; a(578): - 35,5° (c=1, MeOH)

5.1.3.4. Alanyl-Alanyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

5.1.3.4.1. t.-Boc-Alanyl-Alanyl-Alaninmethylester

15 mmol Ala-Ala-OMexHCl (3,16 g) wurden nach 4.2.2.2. mit 15 mmol Boc-Ala (2,84 g) in DMF gekuppelt und aufgearbeitet. Das Produkt wurde aus Ethylacetat/Petroläther kristallisiert.
Fp: 187°C Ausbeute: 2,43 g (47% d.Th.)

$C_{15}H_{27}N_3O_6$ (345,39) Rf (I) 0,83 Rf(II) 0,82

a(546): - 91,0°; a(578): - 79,5° (c=1, MeOH)

5.1.3.4.2. Debocylierung des geschützten Produktes

6 mmol Boc-Ala-Ala-Ala-OMe (2,07 g) wurden nach 4.2.2.3.2. in 15 ml 1 N HCl/HOAc debocyliert. Das Peptid wurde aus Trichlormethan/Äther kristallisiert (hygroskop. weiße Nadeln)
Fp.: 166-167°C Ausbeute: 1,64 g (97% d.Th.)

$C_{10}H_{20}N_3O_4Cl$ (281,74) Rf (I) 0,48 Rf(II) 0,6

a(546): - 68,5°; a(578): - 60,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.5. Phenylalanyl-Glycyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

Diese Sequenz konnte nicht in der üblichen Reihenfolge: Boc-Gly-Ala-OMe ---> Gly-Ala-OMexHCl ---> Boc-Phe-Gly-Ala-OMe ---> Phe-Gly-Ala-OMexHCl in N-terminaler Richtung aufgebaut werden, da die Debocylierung des Boc-Gly-Ala-OMe unter Säureeinfluß zu Zyklisierungen des freien Peptidmethylesters führten. Die Synthese gelang von Boc-Phe ausgehend in C-terminaler Richtung über Boc-Phe-Gly-OMe ---> Boc-Phe-Gly ---> Boc-Phe-Gly-Ala-OMe ---> Phe-Gly-Ala-OMexHCl.

5.1.3.5.1. t.-Boc-Phenylalanyl-Glycinmethylester

20 mmol Gly-OMexHCl (2,52 g) wurden nach 5.1.2.1.1. mit 20 mmol Boc-Phe (5,2 g) und 20 mmol HOBt (2,7 g) in Dichlormethan umgesetzt. Das Peptid wurde aus Äther/Petroläther kristallisiert. Fp.: 94°C Ausbeute: 6,08 g (90% d.Th.)

$C_{17}H_{24}N_2O_5$ (336,38) Rf (I) 0,78 Rf (II) 0,79

a(546): - 2,0°; a(578): - 2,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.5.2. t.-Boc-Phenylalanyl-Glycin

15 mmol Boc-Phe-Gly-OMe (5,04 g) wurden mit 8,1 ml 2 N NaOH in 25 ml Aceton 2 Stunden bei Raumtemperatur verseift. Anschließend wurde nach 5.1.2.1.2. aufgearbeitet. Das Produkt kristallisierte aus Äther/Petroläther.
Fp.: 165°C Zers. Ausbeute: 3,74 g (77% d.Th.)

$C_{16}H_{22}N_2O_5$ (322,36) Rf (I) 0,87 Rf (II) 0,73

a(546): - 9,5°; a(578): - 9,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.5.3. t.-Boc-Phenylalanyl-Glycyl-Alaninmethylester

10 mmol Ala-OMexHCl (1,4 g) wurden mit 10 mmol Boc-Phe-Gly (3,22 g) nach 5.1.2.1.1. in Dichlormethan umgesetzt. Das Peptid wurde aus Ethylacetat/Petroläther gewonnen.
Fp.: 123-124°C Ausbeute: 3,45 g (85% d.Th.)

$C_{20}H_{29}N_3O_6$ (407,46) Rf (I) 0,85 Rf (II) 0,87

a(546): - 20,5°; a(578): - 18,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.5.4. Debocylierung des Kupplungsprodukts

8 mmol Boc-Phe-Gly-Ala-OMe (3,26 g) wurden nach 4.2.2.3.2. mit 20 ml 1 N HCl/HOAc behandelt und aufgearbeitet. Die Kristallisation erfolgte aus Methanol/Äther.
Fp.: 181-183°C Zers. Ausbeute: 2,66 g (97% d.Th.)

$C_{15}H_{22}N_3O_4Cl$ (343,81) Rf (I) 0,49 Rf (II) 0,62

a(546): + 1,0°; a(578): - 5,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.6. Glycyl-Glycyl-Alaninmethylester-Hydrochlorid

Dieses Peptid mußte wegen der oben erwähnten Zyklisierungsgefahr bei Debocylierung des Boc-Gly-Ala-OMe analog 5.1.3.5. aus Boc-Gly-Gly und Ala-OMexHCl aufgebaut werden.

5.1.3.6.1. t.-Boc-Glycyl-Glycyl-Alaninmethylester

7.5 mmol Ala-OMexHCl (1,05 g) und 7,5 mmol Boc-Gly-Gly (1,75 g) wurden nach 5.1.2.1.1. in Dichlormethan umgesetzt. Das Peptid wurde aus Dichlormethan/Petroläther kristallin gewonnen. Fp.: 120-121°C Ausbeute: 1,75 g (74% d.Th.)

$C_{13}H_{23}N_3O_6$ (317,34) Rf (I) 0,75 Rf (II) 0,83

a(546): - 35,5°; a(578): - 31,0° (c=1, MeOH)

5.1.3.6.2. Debocylierung des geschützten Peptids

5 mmol Boc-Gly-Gly-Ala-OMe (1,59 g) wurden nach 4.2.2.3.2. mit 15 ml 1 N HCl/HOAc debocyliert. Das Peptid wurde aus Methanol/Äther kristallisiert.
Fp.: 202-203°C Zers. Ausbeute: 1,13 g (89% d.Th.)

$C_8 H_{16} N_3 O_4 Cl$ (253,68) Rf (I) 0,35 Rf (II) 0,53

a(546): - 48,0°; a(578): - 45,0° (c=1, MeOH)

5.1.4. Synthese der geschützten Pentapeptide

5.1.4.1. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Phenylalanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

5 mmol Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (2,7 g) wurden mit 5 mmol Boc-Gly-Phe nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4.2.2.2. in DMF kondensiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der Variation für feste Präzipitate durch wiederholtes Lösen mit DMF/HMP und Fällen in den unter 4.2.2.2. angeführten Waschlösungen. Das neutral gewaschene Präzipitat wurde über KOH/P O im Vakuum getrocknet und anschließend von mitgerissenem DC-Harnstoff und Spuren der Ausgangsprodukte durch mehrmaliges Auskochen mit Methanol befreit. Zur Entfernung des Methanols wurde das sehr reine Peptid im Vakuum getrocknet.
Fp.: 218°C Zers. Ausbeute: 1,22 g (30% d.Th.)

$C_{45} H_{53} N_5 O_9$ (807,945) Rf (I) 0,87 Rf (II) 0,91

a(546): - 26,0°; a(578): - 24,5° (c=1, DMF)

5.1.4.2. t.-Boc-Glycyl-Alanyl-Phenylalanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

5 mmol Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (2,7 g) wurden mit 5 mmol Boc-Gly-Ala (1,23 g) nach 4.2.2.2. in DMF umgesetzt und das feste Reaktionsprodukt, wie beschrieben, aufgearbeitet. Nach Auskochen mit abs. MeOH erhielt man das reine geschützte Pentapeptid, das im Vakuum sorgfältig getrocknet wurde.

Fp.: 225-226°C Zers. Ausbeute: 2,34 g (66% d.Th.)

$C_{39}H_{49}N_5O_9$ (731,84) Rf (I) 0,85 Rf (II) 0,83

a(546): - 37,5°; a(578): - 34,0° (c=1, DMF)

5.1.4.3. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Alanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

2 mmol Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (952 mg) wurden mit 2 mmol Boc-Gly-Phe (640 mg) nach 4.2.2.2. in DMF gekuppelt und aufgearbeitet. Nach Auskochen mit abs. MeOH wurde das gereinigte Produkt im Vakuum getrocknet.
Fp.: 223-224°C Zers. Ausbeute: 1,0 g (68% d.Th.)

$C_{39}H_{49}N_5O_9$ (731,84) Rf (I) 0,85 Rf(II) 0,87

a(546): - 18,0°; a(578): - 15,5° (c=1, DMF)

5.1.4.4. t.-Boc-Glycyl-Alanyl-Alanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

2 mmol Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (952 mg) wurden mit 2 mmol Boc-Gly-Ala (493 mg) nach 4.2.2.2.in DMF umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Auskochen mit abs. MeOH wurde das gereinigte Peptid im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.
Fp.: 233-234°C Zers. Ausbeute: 800 mg (61% d.Th.)

$C_{33}H_{45}N_5O_9$ (655,74) Rf (I) 0,75 Rf (II) 0,84

5.1.4.5. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Phenylalanyl-Alanyl-Alaninmethylester

3 mmol Phe-Ala-Ala-OMexHCl (1,07 g) und 3 mmol Boc-Gly-Phe

(0,96 g) wurden nach 4.2.2.2. in DMF gekuppelt und aufgearbeitet. Nach Auskochen mit abs. MeOH wurde das gereinigte Produkt im Vakuum getrocknet.
Fp.: 200-202°C Zers. Ausbeute: 995 mg (53% d.Th.)

$C_{32}H_{43}N_5O_8$ (625,725) Rf (I) 0,9 Rf (II) 0,92

a(546): - 35,5°; a(578): -31,0° (c=1, DMF)

5.1.4.6. t.-Boc-Glycyl-Alanyl-Phenylalanyl-Alanyl-Alaninmethylester

3 mmol Phe-Ala-Ala-OMexHCl (1,07 g) und 3 mmol Boc-Gly-Ala (739 mg) wurden nach 4.2.2.2. in DMF gekuppelt und aufgearbeitet. Das über KOH/P O nach Waschen in Bicarbonat-, Bisulfat und Wasser getrocknete Produkt wurde zur vollständigen Entfernung des mitgerissenen DC-Harnstoffs mehrmals aus abs. MeOH umkristallisiert, da es sich darin in der Siedehitze löste. Fp.: 222°C Zers. Ausbeute: 190 mg (12% d.Th.)

$C_{26}H_{39}N_5O_8$ (549,62) Rf (I) 0,82 Rf (II) 0,88

a(546): - 23,0°; a(578): - 20,0° (c=1, DMF)

5.1.4.7. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Alanyl-Alanyl-Alaninmethylester

2,5 mmol Ala-Ala-Ala-OMexHCl (705 mg) wurden mit 2,5 mmol Boc-Gly-Phe (806 mg) in DMF nach 4.2.2.2. umgesetzt und aufmehrmals aus abs. MeOH unter großen Ausbeuteverlusten umkristallisiert. Fp.: 234-235°C Ausbeute: 95 mg (5% d.Th.)
$C_{26}H_{39}N_5O_8$ (549,62) Rf (I) 0,82 Rf (II) 0,87

a(546): - 23,0°; a(578): - 12,0° (c=1, DMF)

5.1.4.8. t.-Boc-Glycyl-Glycyl-Phenylalanyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

5 mmol Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (2,7 g) und 5 mmol Boc-Gly-Gly (1,16 g) wurden nach 4.2.2.2. mit DCC in DMF umgesetzt. Nach Auskochen mit abs. MeOH wurde das gereinigte Peptid im Vakuum getrocknet.

Fp.: 204-205°C Zers. Ausbeute: 2,06 g (57% d.Th.)

$C_{38}H_{47}N_5O_9$ (717,81) Rf (I) 0,79 Rf (II) 0,74)

a(546): - 25,0°; a(578): - 22,0° (c=1, DMF)

5.1.4.9. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Glycyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

4 mmol Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (1,8 g) wurden mit 4 mmol Boc-Gly-Phe (1,28 g) in DMF nach 4.2.2.2. verknüpft. Das mit abs. MeOH ausgekochte Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Fp.: 197-198°C Ausbeute: 2,04 g (71% d.Th.)

$C_{38}H_{47}N_5O_9$ (717,81) Rf (I) 0,79 Rf (II) 0,79

a(546): - 7,5°; a(578): - 6,5° (c=1, DMF)

5.1.4.10. t.-Boc-Glycyl-Glycyl-Glycyl-(O-Benzyl)Tyrosyl-Alaninmethylester

4 mmol Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl (1,8 g) und 4 mmol Boc-Gly-Gly (929 mg) wurden nach 4.2.2.2. mit DCC in DMF umgesetzt. Nach Auskochen mit abs. MeOH wurde das gereinigte Peptid im Vakuum getrocknet.

Fp.: 183-184°C Ausbeute: 895 mg (35% d.Th.)

$C_{31}H_{41}N_5O_9$ (627,69) Rf (I) 0,75 Rf (II) 0,81

a(546): 0,0°; a(578): - 1,5° (c=1, DMF)

5.1.4.11. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Phenylalanyl-Glycyl-Alaninmethylester

2 mmol Phe-Gly-Ala-OMeXHCl (688 mg) und 2 mmol Boc-Gly-Phe (612 mg) wurden nach 4.2.2.2. in Dichlormethan umgesetzt. Nach Reaktionsende filtrierte man vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der ölige Rückstand wurde in wenig Dichlormethan aufgenommen. Nach kurzem Stehen der Lösung kristallisierte das Peptid aus. Es wurde abfiltriert und anschließend sorgfältig im Vakuum von anhaftendem Dichlormethan befreit. Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt in DMF gelöst und nach 4.2.2.2. in den angeführten Waschlösungen wiederholt gefällt. Das über KOH/P O i. Vak. getrocknete Produkt wurde abschließend durch Auskochen mit abs. MeOH von mitgerissenem DC-Harnstoff befreit und sorgfältig getrocknet.

Fp.: 173°C Zers. Ausbeute: 710 mg (58% d.Th.)

$C_{31}H_{41}N_5O_8$ (611,69) Rf (I) 0,88 Rf (II) 0,87

a(546): - 30,0°; a(578): - 25,5° (c=1, DMF)

5.1.4.12. t.-Boc-Glycyl-Glycyl-Phenylalanyl-Glycyl-Alaninmethylester

4 mmol Phe-Gly-Ala-OMexHCl (1,375 g) und 4 mmol Boc-Gly-Gly wurden nach 4.2.2.2. mit DCC in Dichlormethan umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in wenig abs. MeOH aufgenommen. Man versetzte die Lösung mit dem 4-5-fachen Volumen Dichlormethan und ließ das Produkt in der Kälte auskristallisieren. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit kaltem Dichlormethan gewaschen, im Luftstrom getrocknet und aus MeOH/Dichlormethan umkristallisiert.

Fp.: 176°C Zers. Ausbeute: 615 mg (29% d.Th.)

$C_{24}H_{35}N_5O_8$ (521,56) Rf (I) 0,82 Rf (II) 0,82

a(546): - 20,0°; a(578): - 19,0° (c=1, DMF)

5.1.4.13. t.-Boc-Glycyl-Phenylalanyl-Glycyl-Glycyl-Alaninmethylester

1,5 mmol Gly-Gly-Ala-OMexHCl (380 mg) wurden mit 1,5 mmol Boc-Gly-Phe (480 mg) nach 4.2.2.2. in Dichlormethan/DMF (1:1) gekuppelt. Da das ausfallende Triäthylammoniumchlorid nicht abzufiltrieren war, wurde die Reaktion in Suspension durchgeführt. Nach Reaktionsende wurde vom DC-Harnstoff abfiltriert, Dichlormethan im Vakuum entfernt und nach kurzem Stehen das ausgefallene Triäthylammoniumchlorid abgesaugt. Die klare Lösung der Kupplungsprodukte in DMF wurde nach 4.2.2.2. weiterverarbeitet und das über KOH/P O i. Vak. getrocknete Präzipitat abschließend mit abs. MeOH ausgekocht.

Fp.: 177°C Zers. Ausbeute: 320 mg (40% d.Th.)

$C_{24}H_{35}N_5O_8$ (521,56) Rf (I) 0,79 Rf (II) 0,82

a(546): - 24,0°; a(578): - 23,0° (c=1, DMF)

5.1.4.14. Abspaltung der O-Benzyl- und der Boc-Schutzgruppen zum Einsatz der Peptide in der Semisynthese

Unmittelbar vor Beginn der Semisynthese wurden die Pentapeptidmethylester durch katalytische Hydrierung der Benzylschutzgruppe und die anschließende Abspaltung der Boc-Gruppe aus ihren geschützten Formen freigesetzt:

5.1.4.15. Katalytische Hydrierung der tyrosinhaltigen Peptide

Die vollständig geschützten Peptide wurden nach 4.2.2.3.1. hydriert, die Pd-Aktivkohle abfiltriert, das Lösungsmittel

abgezogen und das debenzylierte Boc-Peptid aus EtOH/Petroläther kristallisiert. Die hydrierten Produkte waren in der DC einheitlich, hatten kleinere Rf-Werte als ihre O-Benzyl-geschützten Formen und reagierten Pauly-positiv. Die Ausbeuten lagen zwischen 90 und 98% der Theorie.

5.1.4.16. Debocylierung der Tyrosin-haltigen und der Tyrosin-freien Peptide

Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte nach 4.2.2.3.2. mit 1 N HCl/HOAc. Man erhielt die Produkte durch Kristallisation aus MeOH/Äther in fester Form. Sie waren in der Dünnschichtchromatographie einheitlich. Ausbeute: 90-95% d.Th.

5.1.5. Elementaranalysen der synthetisierten Oligopeptide

5.1.5.1. Dipeptidfragmente B23-24 (5.1.2.)

Peptid	C; H; N (%) gef.	(C; H; N (%) ber.)
Boc-Gly-Phe	59,73; 7,12; 8,83	(59,99; 6,29; 8,74)
Boc-Gly-Ala	48,78; 7,48; 11,31	(48,79; 7,37; 11,37)
Boc-Gly-Gly	46,76; 6,95; 12,07	(46,55; 6,95; 12,06)

5.1.5.2. Tripeptidfragmente B25-27 (5.1.3.)

Peptid	C; H; N (%) gef. (C; H; N; (%) ber.)
Boc-Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	63,28; 7,16; 8,17 (63,74; 7,07; 8,17)
Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMexHCl	60,09; 7,31; 9,39 (59,54; 6,52, 9,06)
Boc-Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	63,58; 7,08; 8,28 (63,14; 6,87; 8,18)
Boc-Ala-Ala-OMe	52,29; 8,20; 10,09 (52,54; 8,08; 10,21)
Ala-Ala-OMexHCl	39,61; 7,46; 13,07 (39,91; 7,18; 13,30)
Boc-Phe-Ala-Ala-OMe	60,01; 7,41; 10,04 (59,84; 7,41; 9,97)
Phe-Ala-Ala-OMexHCl	52,64; 6,74; 11,72 (53,70; 6,76; 11,72)
Boc-Ala-Ala-Ala-OMe	51,88; 7,82; 12,43 (52,16; 7,88; 12,17)
Ala-Ala-Ala-OMexHCl	42,56; 7,23; 14,91 (42,63; 7,16; 14,91)
Boc-Phe-Gly	59,65; 6,94; 8,79 (59,62; 6,88; 8,69)
Boc-Phe-Gly-Ala-OMe	59,37; 7,47; 10,39 (58,95; 7,17; 10,31)
Phe-Gly-Ala-OMexHCl	51,77; 6,56; 12,66 (52,40; 6,45; 12,22)
Boc-Gly-Gly-Ala-OMe	49,82; 7,47; 13,17 (49,20; 7,31; 13,24)
Gly-Gly-Ala-OMexHCl	38,22; 6,59; 16,77 (37,78; 6,36; 16,56)

5.1.5.3. Geschützte Pentapeptide (5.1.4.)

Peptid	C; H; N (%) gef. (C; H; N (%) ber.)
Boc-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	66,73; 6,70; 8,47 (66,90; 6,61; 8,67)
Boc-Gly-Ala-Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	63,90; 6,79; 9,51 (64,01; 6,75; 9,57)
Boc-Gly-Phe-Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	63,69; 6,70; 9,51 (64,01; 6,75; 9,57)
Boc-Gly-Ala-Ala-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	60,41; 6,91; 10,56 (60,44; 6,91; 10,68)
Boc-Gly-Phe-Phe-Ala-Ala-OMe	61,34; 6,90; 11,14 (61,43; 6,93; 11,19)
Boc-Gly-Ala-Phe-Ala-Ala-OMe	56,66; 7,16; 12,75 (56,82; 7,15; 12,74
Boc-Gly-Phe-Ala-Ala-Ala-OMe	56,56; 7,16; 12,79 (56,82; 7,15; 12,74)
Boc-Gly-Gly-Phe-Tyr(Bzl)-Ala-OM	63,57; 6,67; 9,70 (63,58; 6,60; 9,76)
Boc-Gly-Phe-Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	63,31; 6,55; 9,58 (63,58; 6,60; 9,76)
Boc-Gly-Gly-Gly-Tyr(Bzl)-Ala-OMe	59,48; 6,62; 11,16 (59,32; 6,58; 11,16)
Boc-Gly-Phe-Phe-Gly-Ala-OMe	61,25; 7,15; 11,54 (60,87; 6,76, 11,45)
Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-Ala-OMe	55,99; 6,87; 13,33 (55,27; 6,76; 13,43)
Boc-Gly-Phe-Gly-Gly-Ala-OMe	55,29; 7,05; 13,02 (55,27; 6,76; 13,43)

5.2. Semisynthese der B24-26-variierten Alanin-B27-Destripeptidinsuline

5.2.1. Chemisch-semisynthetisch dargestellte Analoga

1. AlaninB27-Destripeptidinsulin, (AlaB27-DTrI) = DOI-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala
2. AlaB24-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Ala-Phe-Tyr-Ala
3. AlaB25-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala
4. AlaB24-AlaB25-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Ala-Ala-Tyr-Ala
5. AlaB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Phe-Ala-Ala
6. AlaB24-AlaB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Ala-Phe-Ala-Ala
7. AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Ala-Ala-Ala

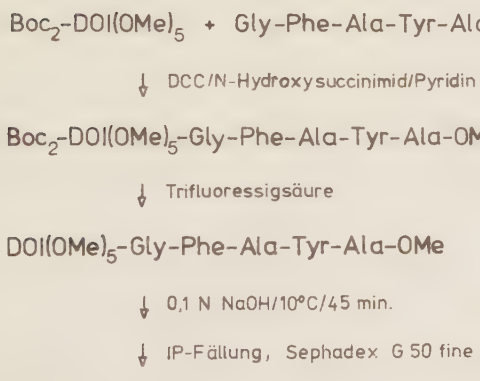

Abb. 4: Schema des chemischen Semisyntheseweges am Beispiel des AlaB25-AlaB27-Destripeptidinsulins

5.2.1.1. AlaninB27-Destripeptidinsulin (5), (AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 25 mg di-Boc-DOI$(OMe)_5$ (5 umol) und 10,5 mg Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-OMexHCl erfolgte nach 4.2.3.1. Die Boc-Gruppen wurden nach 4.2.3.1.1. entfernt. Zur Aufarbeitung des debocylierten Kupplungsansatzes wurden 4 Varianten erprobt:

5.2.1.1.1. Erste Reinigung des Kupplungsprodukts über Sephadex Verseifung der Methylestergruppen, IP-Fällung und zweite Reinigung über Sephadex

Das Präzipitat des debocylierten Kupplungsproduktmethylesters wurde in 1 ml 0,2 N HOAc gelöst und über eine Sephadex G50 superfine-Säule (1,5x95cm) getrennt. Das Produkt wurde mit 0,2 N HOAc eluiert, die Fraktionen des Hauptelutionspeaks in zwei Teilen gesammelt und lyophilisiert.

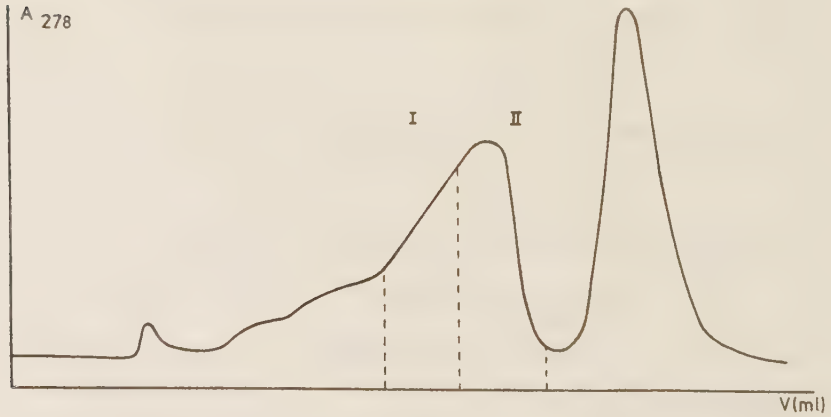

Abb. 5: 1.Reinigung des Kupplungsprodukts über eine Sephadex G50 superfine-Säule (1,5x95cm)

Ausbeute: Teil I: ca. 7 mg
Teil II: ca. 6 mg

Die Verseifung der Methylestergruppen wurde in 0,1 N NaOH nach 4.2.3.1.2. vorgenommen. Die Teile I und II wurden separat behandelt und jeweils bei pH 5,0 IP-gefällt. Nach Zentrifugation wurden die Niederschläge in 0,2 N HOAc gelöst und über eine Sephadex G50 superfine-Säule (1,2x42cm) in 0,2 N Essigsäure getrennt.

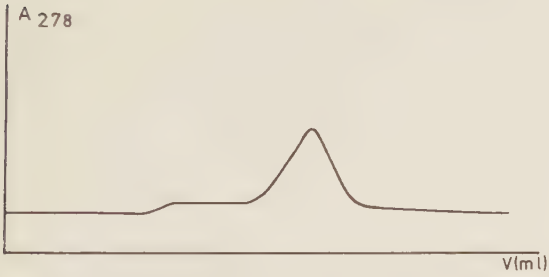

Abb. 6: 2.Reinigung des verseiften AlaB27-DTrI über Sephadex G50 superfine (1,2x42cm)

Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

Ausbeute:	Teil I:	ca. 2 mg	0% Methoxylgehalt
	Teil II:	ca. 1 mg	0% Methoxylgehalt

Teil I: enthielt AlaB27-DTrI mit 50-60% Kupplungsrate. In der IEF erhielt man mehrere Banden, deren intensivste bei pH 6,2-6,4 und pH 4,8-5,0 lagen (5.2.3.2.)
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca. 5%

Teil II: enthielt AlaB27-DTrI mit ca. 40% Kupplungsrate. Die Zusammensetzung in der IEF-Analyse entsprach dem Teil I (siehe 5.2.3.2.).
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 5%

5.2.1.1.2. Verseifung des debocylierten Kupplungsansatzes und Reinigung über Sephadex G50 superfine in 0,2 N Essigsäure

Die Verseifung der Methoxylgruppen des Kupplungsproduktes erfolgte nach der Vorschrift 4.2.3.1.2. im Anschluß an die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen. Das Produkt wurde am angenommenen IP bei pH 5,0 gefällt, abzentrifugiert, in 0,2N HOAc gelöst und über eine Sephadex G50 superfine-Säule (1,5x95cm), die in 0,2 N HOAc äquilibriert war, getrennt. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden gesammelt und lyophilisiert.

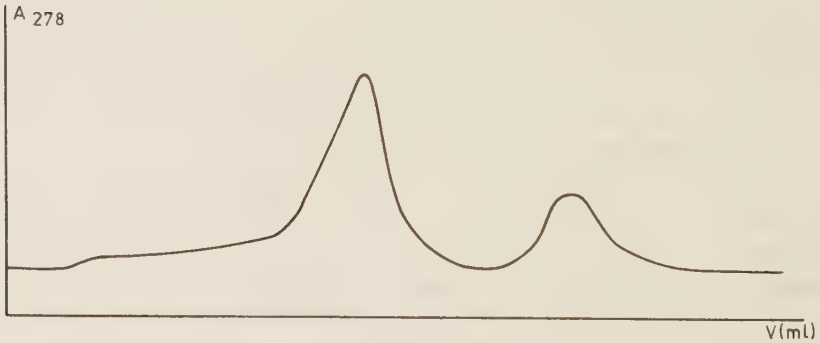

Abb. 7: Auftrennung des verseiften Kupplungsprodukts über eine Sephadex G50 superfine-Säule (1,5x95cm)

Ausbeute: 7-9 mg 0% Methoxylgehalt

Das Produkt enthielt AlaB27-DTrI
mit 45-50% Kupplungsrate.
In der IEF zeigte das Produkt mehrere Banden, deren intensivste bei pH 6,2-6,4 und pH 4,8-5,0 lagen (siehe 5.2.3.2.).
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca. 7%.

Da bei beiden Aufarbeitungsvarianten in der IEF Banden bei pH 6,2-6,4 auftraten, die ca. 50-60% Gesamtanteil hatten, man aber keine Methoxylgruppen mehr nachweisen konnte, mußte man annehmen, daß eine Carboxylgruppe des Insulinderivats auf andere Weise blockiert war. Eine analoge Beobachtung machten Gattner & Schmitt (49) bei Verseifung des Insulinhexamethylesters im alkalischen Millieu, die zum teilweisen Anstieg des IP des verseiften Insulins auf pH 6,8 - in der IEF nachgewiesen - führte und auf die Bildung des A21-Asparaginimids durch Ringschluß bei der alkalischen Hydrolyse des A21-Methylesters zurückzuführen war. Das Auftreten der Bande bei pH 6,2-6,4 und die stark erniedrigte biologische Aktivität der Derivate, wie sie auch von King et al. (70) für A21-Asn-Imid-Insulin beschrieben wurde, wiesen darauf hin, daß die Zyklisierung am A21-Asparagin auch hier stattgefunden hatte. Es wurde daher in einer dritten Aufarbeitungsvariante versucht, den Imid-Anteil durch längere Hydrolysedauer zu reduzieren

5.2.1.1.3. Alkalische Hydrolyse der Methylestergruppen über 15 Stunden bei 4°C (5,47)

Die Verseifung der Methylestergruppen des debocylierten Kupplungsprodukts wurde nach Weitzel et al. (5,47) in wäßriger Lösung mit NaOH bei pH 11,8 über 15 h in der Kälte (4°C) vorgenommen. Nach IP-Fällung bei pH 5,0 wurde das Präzipitat über eine Sephadex G50 fine-Säule (2x120cm), die in 0,1 N Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) äquilibriert war, gereinigt. Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden gesammelt und lyophilisiert. Bei der Elution erschien im Ausschlußvolumen der Säule ein Peak, dessen Fläche größer als der Produktpeak war und der bei der Hydrolyse entstandenes polymeres Material enthielt. Es zeigte nur geringe elektrophoretische Mobilität und war nicht weiter aufzutrennen.

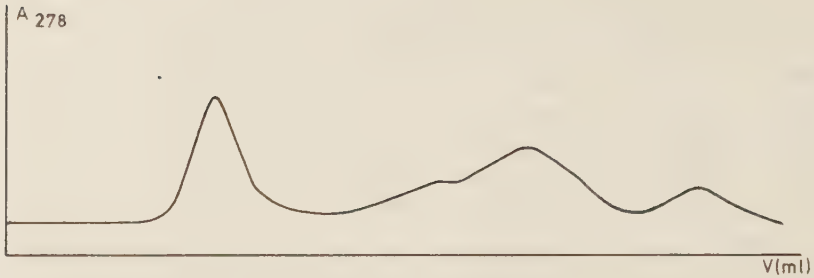

Abb. 8: Reinigung des 15 h verseiften Kupplungsprodukts über Sephadex G50 fine (2x120cm) in 0,1 N NH_4HCO_3

Ausbeute: 5-7 mg 0% Methoxylgehalt

Das Produkt enthielt AlaB27-DTrI mit 60-70% Kupplungsrate.
In der IEF erschien eine starke Bande bei pH 4,8-5,0 neben zahlreichen schwächeren Banden im saureren pH-Bereich, die auf Desamidierungen zurückzuführen waren (siehe 5.2.3.2.).

Biologische Aktivität im Fettzelltest: $< 0{,}2\%$

5.2.1.1.4. Verseifung des debocylierten Kupplungsansatzes und Reinigung über Sephadex G50 fine in 0,1 N Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0)

Der debocylierte Kupplungsansatz wurde nach 4.2.3.1.2. in 0,1 N NaOH 45 min. bei 10°C verseift. Nach IP-Fällung bei pH 5,0 wurde der Niederschlag abzentrifugiert, in wenig Laufmittel gelöst und über eine Sephadex G50 fine-Säule (2x120cm) mit 0,1 N Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0 als Laufmittel getrennt. Es erschien ein unsymmetrischer Hauptpeak, der einen langen Schwanz bildete. Seine Fraktionen wurden in zwei Teilen gesammelt und lyophilisiert.

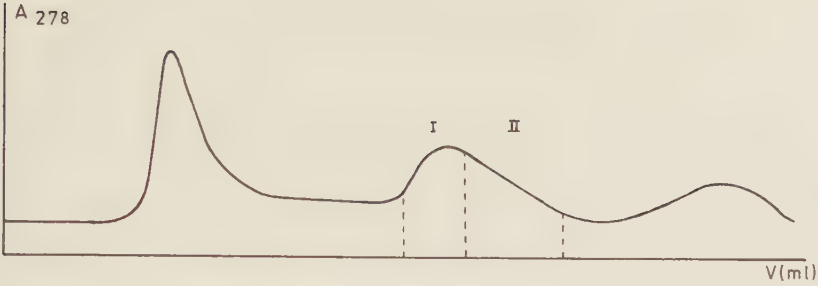

Abb. 9: Reinigung des 45 min. hydrolysierten AlaB27-DTrI über Sephadex G50 fine in 0,1 N NH_4HCO_3 pH 8,0

Ausbeute: Teil I (Peakmaximum): 6-8 mg 0% Methoxylgehalt
Teil II (Schwanz): 3-5 mg 0% Methoxylgehalt

Teil I enthielt unvollständig gekuppeltes AlaB27-DTrI mit 40-60% Kupplungsrate.
In der IEF erschienen neben schwächeren zwei starke Banden bei pH 4,8-5,0 (ca. 40% Anteil) und pH 6,2-6,4 (ca. 60% Anteil) (siehe 5.2.3.2.).
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 5-10%

Teil II enthielt AlaB27-DTrI mit ca.90% Kupplungsrate.
In der IEF erschienen neben schwachen zwei Hauptbanden bei pH 4,8-5,0 (30-50%) und pH 6,2-6,4 (50-70%) (siehe 5.2.3.2.).
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca. 15%

Der Vorpeak im Säulenausschlußvolumen enthielt Polymere.

5.2.1.2. AlaninB24-AlaninB27-Destripeptidinsulin
(AlaB24-AlaB27-DTrI)

25 mg di-Boc-DOI(OMe)$_5$ (5 umol) und 10 mg Gly-Ala-Phe-Tyr-Ala-OMexHCl (15 umol) wurden nach 4.2.3.1 gekuppelt. Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte nach 4.2.3.1.1..
Die Aufarbeitung erfolgte nach der unter 5.2.1.1.4. beschriebenen Variante.

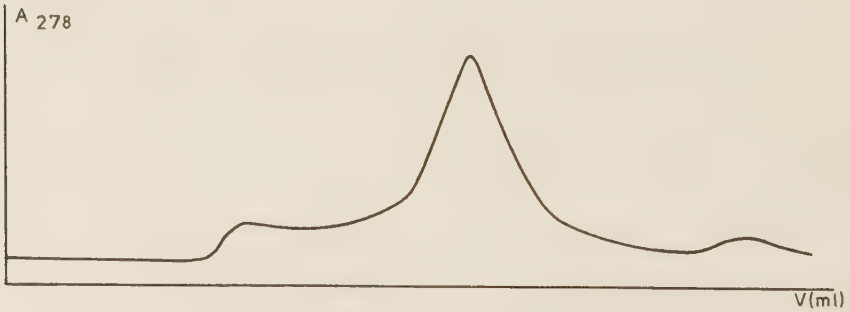

Abb.10: Reinigung von AlaB24-AlaB27-DTrI
über Sephadex G50 fine in 0,1 N NH_4HCO_3 pH 8,0

Ausbeute: 7-10 mg pro Säulenlauf

Der nahezu symmetrische Elutionspeak enthielt AlaB24-AlaB27-DTrI in 50-70% Kupplungsrate.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca. 0,2%

5.2.1.3. AlaninB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin
(AlaB25-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung wurde nach 4.2.3.1. mit 50 mg di-Boc-DOI(OMe)$_5$ (10 umol) und 18,7 mg Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-OMexHCl (30 umol), die Abspaltung der Boc-Gruppen nach 4.2.3.1.1. ausgeführt.
Es wurde nach 5.2.1.1.4. aufgearbeitet.

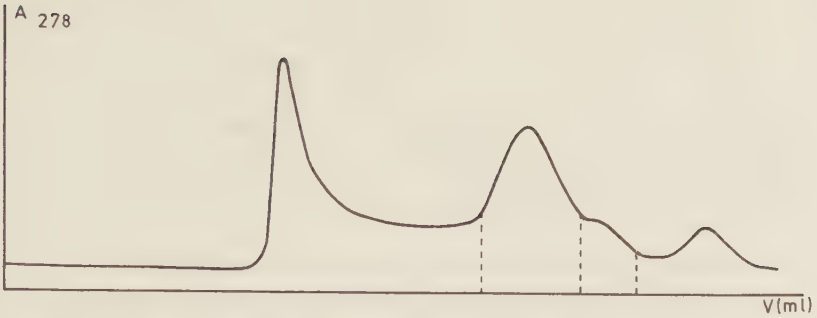

Abb.11: Reinigung von AlaB25-AlaB27-DTrI
über Sephadex G50 fine

Ausbeute: Hauptpeak 12-15 mg pro Säulenlauf
Schulter 3-4 mg

Der Hauptpeak enthielt AlaB25-AlaB27-DTrI,
Kupplungsrate 60-70%
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 3-5%

Die Schulter im Anschluß an den Hauptpeak enthielt
zu 30-50% gekuppeltes AlaB25-AlaB27-DTrI
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 3-4%

Der Vorpeak im Säulenausschlußvolumen enthielt
polymeres Material

5.2.1.4. AlaninB24-AlaninB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin
(AlaB24-AlaB25-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 25 mg di-Boc-DOI$(OMe)_5$ (5 umol) mit 8 mg Gly-Ala-Ala-Tyr-Ala-OMexHCl (15 umol) wurde nach 4.2.3.1. ausgeführt und die Boc-Gruppen nach 4.2.3.1.1. abgespaltet. Es wurde nach 5.2.1.1.2. aufgearbeitet.

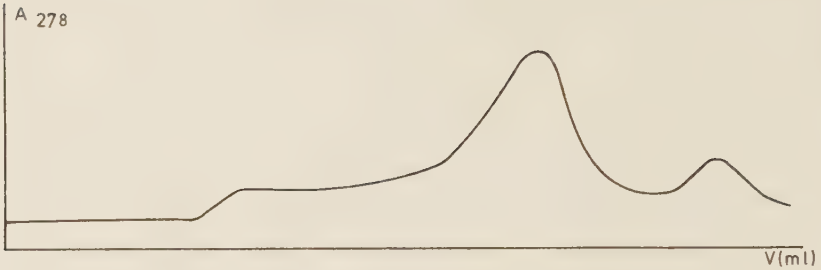

Abb.12: Reinigung von AlaB24-AlaB25-AlaB27-DTrI über Sephadex G50 fine in 0,2 N HOAc

Ausbeute: 7-10 mg pro Säulenlauf

Das Produkt enthält zu 30-60% gekuppeltes AlaB24-AlaB25-AlaB27-DTrI.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: <0.1%

5.2.1.5. AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB26-AlaB27-DTrI)

25 mg di-Boc-DOI(OMe)$_5$ (5 umol) wurden nach 4.2.3.1. mit 8,4 mg Gly-Phe-Phe-Ala-Ala-OMexHCl (15 umol) gekuppelt, die Boc-Gruppen nach 4.2.3.1.1. entfernt und das Rohprodukt nach 5.2.1.1.4. aufgearbeitet.

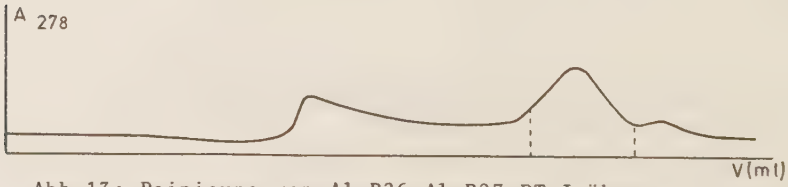

Abb.13: Reinigung von AlaB26-AlaB27-DTrI über Sephadex G50 fine

Ausbeute: Hauptpeak 7-8 mg pro Säulenlauf
Schulter 1-2 mg

Der Hauptpeak enthielt zu 50-60% gekuppeltes AlaB26-AlaB27-DTrI.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca. 5%

Die dem Hauptpeak folgende Schulter enthielt zu 30-40% gekuppeltes Produkt.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 1-2%

5.2.1.6. AlaninB24-AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB24-AlaB26-AlaB27-DTrI)

25 mg di-Boc-DOI$(OMe)_5$ (5 umol) wurden nach 4.2.3.1. mit 7,3 mg Gly-Ala-Phe-Ala-Ala-OMexHCl (15 umol) gekuppelt. Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte nach 4.2.3.1.1., die Aufarbeitung nach 5.2.1.1.4..

Abb.14: Reinigung von AlaB24-AlaB26-AlaB27-DTrI

Ausbeute: Hauptpeak 7-8 mg

Das Produkt bestand aus zu 60-70% gekuppeltem AlaB24-AlaB26-AlaB27-DTrI.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: ca.0,15%

5.2.1.7. AlaninB25-AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 25 mg di-Boc-DOI$(OMe)_5$ (5 umol) mit 7,3 mg Gly-Phe-Ala-Ala-Ala-OMexHCl (15 umol) wurde nach 4.2.3.1., die Abspaltung der Boc-Gruppen nach 4.2.3.1.1. und die Aufarbeitung nach 5.2.1.1.4. ausgeführt.

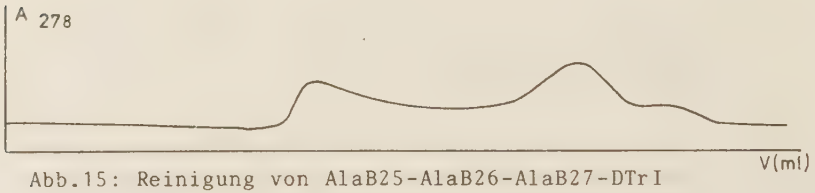

Abb.15: Reinigung von AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI

Ausbeute: 7-8 mg pro Säulenlauf

Der Hauptpeak enthielt AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI,
Kupplungsrate 40-50%.
Biologische Aktivität im Fettzelltest: 8-9%

5.2.2. Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Insuline

1. AlaninB27-Destripeptidinsulin, (AlaB27-DTrI) = DOI-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala
2. AlaB24-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Ala-Phe-Tyr-Ala
3. AlaB25-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala
4. AlaB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Phe-Ala-Ala
5. AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Ala-Ala-Ala

6. GlyB24-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Gly-Phe-Tyr-Ala
7. GlyB25-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Gly-Tyr-Ala
8. GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Gly-Gly-Tyr-Ala
9. GlyB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Phe-Gly-Ala
10. GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Gly-Phe-Gly-Ala
11. GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI = DOI-Gly-Phe-Gly-Gly-Ala

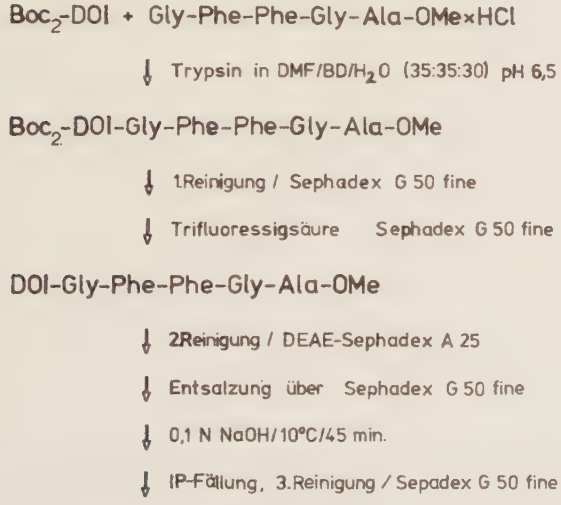
Boc_2-DOI + Gly-Phe-Phe-Gly-Ala-OMe×HCl
Trypsin in DMF/BD/H_2O (35:35:30) pH 6,5
Boc_2-DOI-Gly-Phe-Phe-Gly-Ala-OMe
1.Reinigung / Sephadex G 50 fine
Trifluoressigsäure Sephadex G 50 fine
DOI-Gly-Phe-Phe-Gly-Ala-OMe
2.Reinigung / DEAE-Sephadex A 25
Entsalzung über Sephadex G 50 fine
0,1 N NaOH/10°C/45 min.
IP-Fällung, 3.Reinigung / Sepadex G 50 fine
DOI-Gly-Phe-Phe-Gly-Ala

Abb.16: Schema der enzymatischen Semisynthese mit Trypsin am Beispiel des GlyB26-AlaB27-Destripeptidinsulins

5.2.2.1. Verlauf der enzymatischen Semisynthese und Aufarbeitung des Kupplungsprodukts am Beispiel des AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB27-DTrI)

Die besten Resultate wurden auf folgendem Wege erzielt:

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) wurden mit 55,4 mg Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-OMexHCl (100 umol) und 5 mg Trypsin in DMF/BD/H_2O bei pH 6,5, wie unter 4.2.3.2.1. beschrieben, inkubiert. Nach 8 h und 16 h wurden je 2,5 mg Trypsin zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml HOAc und 2 ml Wasser beendet.

Die 1. Reinigung des Reaktionsansatzes erfolgte nach der Vorschrift 4.2.3.2.2. über eine Sephadex G50 fine-Säule (2,7x 70cm), die mit 3 N HOAc äquilibriert war.

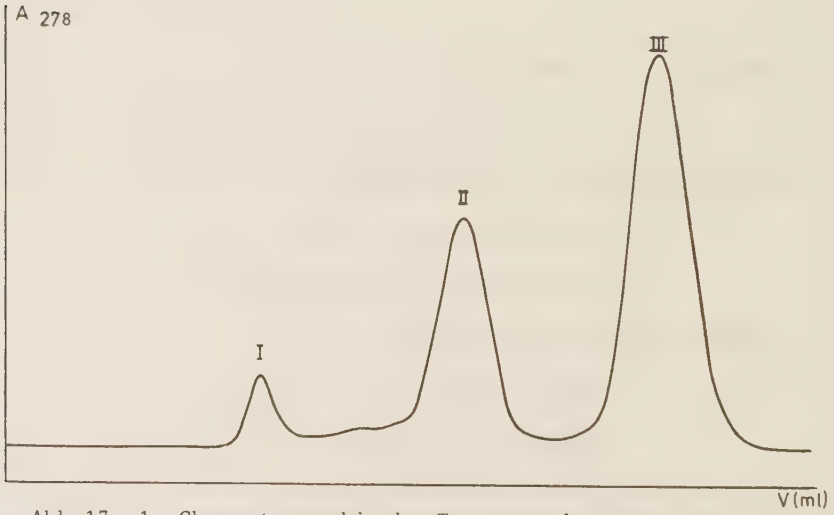

Abb.17: 1. Chromatographische Trennung der Komponenten des Kupplungsansatzes über Sephadex G50 fine (2,7x70cm) am Beispiel des AlaB27-DTrI

Ausbeute: Peak II 35-42 mg pro Säulenlauf

Peak I: erschien im Ausschlußvolumen der Säule und enthielt während der Inkubation gebildete Polymere von di-Boc-DOI, Kupplungsprodukt und Trypsin, die sich nicht weiter auftrennen ließen.

Peak II: enthielt das gewünschte di-Boc-Ala(OMe)B27-DTrI neben ungekuppeltem di-Boc-DOI;
Kupplungsrate: ca. 70%

Peak III: enthielt den überschüßigen Pentapeptidmethylester, hier Gly-Phe-Phe-Tyr-AlaOMe.

Anschließend wurde das lyophilisierte Produkt aus Peak II nach 4.2.3.2.2. debocyliert und nach kurzer Gelfiltration gefriergetrocknet.

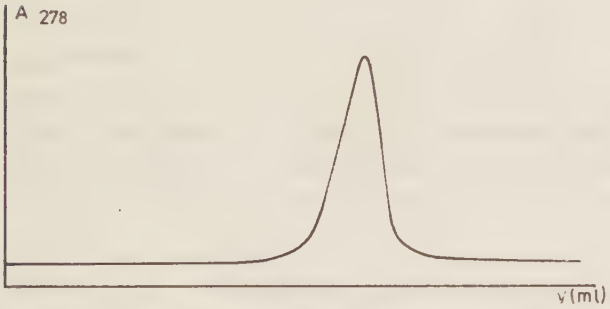

Abb.18.: Gelfiltration des deboylierten Ala(OMe)B27-DTrI über Sephadex G50 fine (1,2x42cm) in 0,2 N HOAc

Ausbeute: 32-40 mg rohes Ala(OMe)DTrI

Die Reinigung dieses Rohproduktes erfolgte nach 4.2.3.2.3. über eine DEAE-Sephadex A25-Säule (1x20cm), die in Startpuffer aus 0,05 mol/l Tris-HCl, pH 7,5, in 40% Isopropanol äquilibriert war. Das in Startpuffer gelöste Rohprodukt wurde auf die Säule aufgetragen und mit 240 ml eines linearen NaCl-Gradienten von 0-0,15 mol/l getrennt. Die Fraktionen des zuerst

(I) eluierten Ala(OMe)B27-DTrI wurden gesammelt, Isopropanol im Vakuum abrotiert und der wäßrige Rückstand vorsichtig auf 1-2 ml Volumen im Vakuum eingeengt. Durch Zugabe von Eisessig wurde die Lösung so angesäuert, daß sich das intermediär ausgefallene Produkt gerade wieder löste.

Die klare Lösung wurde zur Entfernung von Salzen über eine Sephadex G50 fine-Säule (1,5x95cm) (siehe 4.2.3.2.3.) in 0,2N HOAc gereinigt.

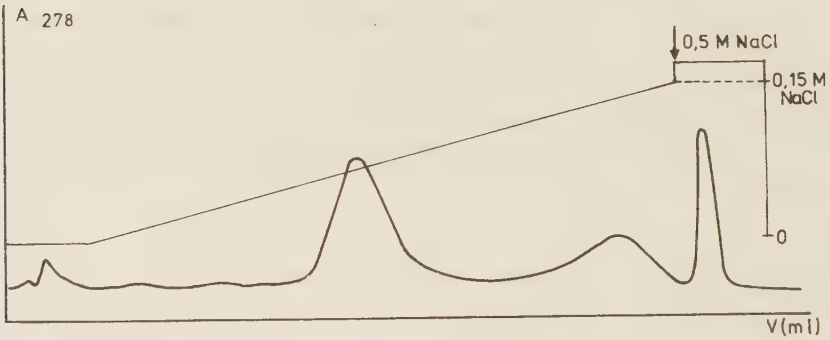

Abb.19: Ionenaustauschchromatographie des Ala(OMe)B27-DTrI über DEAE-Sephadex A25 in 240 ml Gradient-Lösung (0-0,15 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 40% Isopropanol); I: Ala(OMe)B27-DTrI, II: DOI

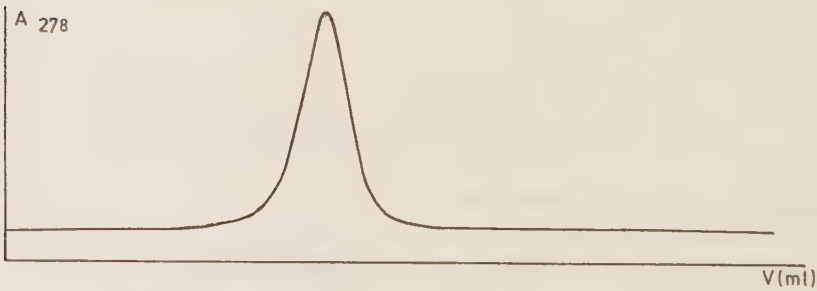

Abb.20: Entsalzung des gereinigten Ala(OMe)B27-DTrI über Sephadex G50 fine nach Reinigung über DEAE-Sephadex A25-Ionenaustauscher

Die Fraktionen des elutierten Peaks wurden gesammelt und

lyophilisiert.
Ausbeute: 8-10 mg

Der B27-Methylester des Kupplungsproduktes war nach der Entsalzung in der Celluloseacetat(CA)-Elektrophorese einheitlich (siehe 5.2.3.1.).

Die Verseifung der C-terminalen B27-Methylestergruppe wurde nach 4.2.3.2.4. ausgeführt. Das verseifte Produkt wurde bei pH 5,0 IP-gefällt, abzentrifugiert und über eine Sephadex G50 fine-Säule (1,2x42cm) (siehe 4.2.3.2.4.) in 0,2 N HOAc gereinigt.

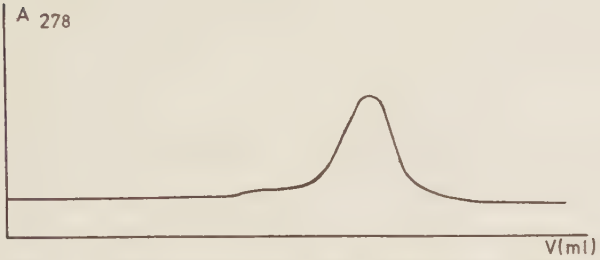

Abb.21: Gelfiltration von AlaB27-DTrI über Sephadex G50 f. nach Verseifung des B27-Methylesters

Ausbeute: 5-7 mg AlaB27-DTrI

Das Produkt war elektrophoretisch einheitlich (siehe 5.2.3.1.).
Kupplungsrate: ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.1.1. Lösungsmitteleinflüße auf die Trypsin-katalysierte Kupplungsreaktion

Die Wahl des Lösungsmittels hing entscheidend von der Löslichkeit der Reaktionspartner und von der Aktivität des Tryp-

sins im Medium ab. Unter Berücksichtigung der Resultate von Inouye et al. (19) wurde der Wasseranteil auf 30% (v/v) festgesetzt und der organische Lösungsmittelanteil von 70% (v/v) in verschiedenen Variationen erprobt.

DMSO und DMSO/BD (1:1) eigneten sich nicht, da sich die Pentapeptidmethylester darin sehr schlecht lösten. In DMF dagegen lösten sich alle Reaktionspartner gut. Die alleinige Verwendung von DMF führte jedoch zu vermehrter Bildung von Polymeren (15-20%), wie die erhöhten, im Ausschlußvolumen der ersten Reinigungssäule erscheinenden Peaks zeigten. Die Kupplungsrate lag hier bei 40-50%.

Die besten Resultate wurden mit DMF/BD (1:1) erzielt. Es wurden Kupplungsraten von ca. 70% erreicht. Die Polymerenbildung lag bei 10%.

5.2.2.1.2. Einfluß des pH-Wertes auf die Kupplungsrate

Die Synthese bei pH 6,0 war nicht durchzuführen, da das einsetzte Oligopeptid beim Einstellen des pH mit HOAc auszufallen begann.

Optimale Syntheseergebnisse konnten bei pH 6,5 nach dem oben beschriebenen Verfahren 5.2.2.1. erzielt werden.

Führte man die Synthese bei pH 7,0 durch, so sank die Kupplungsrate auf 40-50%. Aus der CA-Elektrophorese konnte man den hohen Anteil ungekuppelten di-Boc-DOI's ersehen (siehe

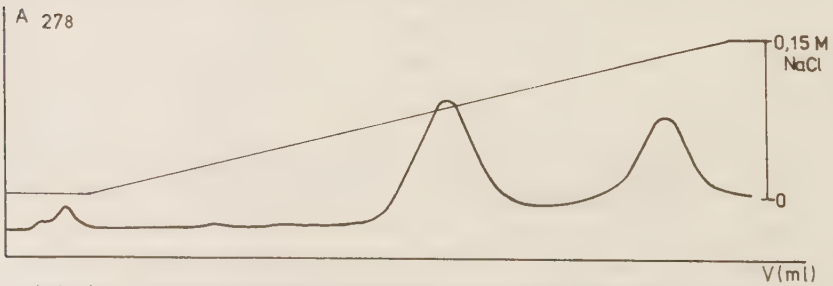

Abb.22: DEAE-Sephadex A25-Ionenaustauschchromatographie des bei pH 7,0 gekuppelten Ala(OMe)B27-DTrI(I); DOI(II)

5.2.3.1). In der DEAE-Sephadex A25-Ionenaustauschchromatographie erhöhte sich der ungekuppeltes DOI enthaltende Peak II beträchtlich.

Die Synthese bei pH 7,5 führte zu noch weit geringeren Anteilen gekuppelten Produkts (ca. 20-30%).

Die weiteren Insulinvarianten wurden daher nach dem unter 5.2.2.1. beschriebenen optimalen Verfahren dargestellt.

5.2.2.2. AlaninB24-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB24-AlaB27-DTrI)

25 mg di-Boc-DOI (5 umol) und 29 mg Gly-Ala-Phe-Tyr-Ala-OMe xHCl (50 umol) wurden nach 4.2.3.2.1. mit 2,5 mg Trypsin zur Reaktion gebracht. Die erste Reinigung des Reaktionsansatzes, die Abspaltung der Boc-Gruppen und anschließende Gelfiltration wurde nach 4.2.3.2.2. vorgenommen.

Ausbeute: 1. Reinigung: 17-20 mg di-Boc-Derivat
(Kupplungsrate: ca. 70%)
Debocylierung: 11-15 mg

Die Reinigung über DEAE-Sephadex A25 und die anschließende Entsalzung erfolgte nach 4.2.3.2.3.

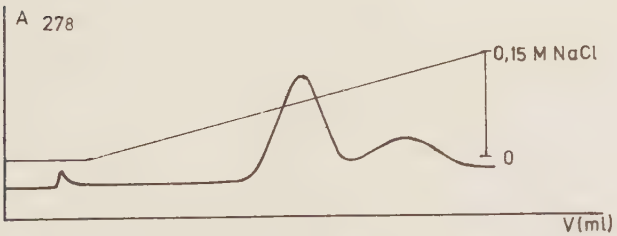

Abb.23: Reinigung von AlaB24-Ala(OMe)B27-DTrI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 6-8 mg entsalztes AlaB24-Ala(OMe)B27-DTrI

Der gereinigte B27-Methylester des Produkts wurde nach der Vorschrift 4.2.3.2.4. hydrolysiert und nach der IP-Fällung über Sephadex G50 fine (1,2x42cm) von eventuell entstandenen Polymeren getrennt.

Ausbeute: 3,5-5 mg AlaB24-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.3. AlaninB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB25-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 25 mg di-Boc-DOI (5 umol) mit 29 mg Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-OMexHCl wurde nach 4.2.3.2.1. durchgeführt.

Die erste Trennung der Reaktionspartner, die Debocylierung und anschließende Gelfiltration erfolgten nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung: 16-20 mg di-Boc-DTrI-Derivat
(Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung 11-15 mg

Es schloß sich die Reinigung über DEAE-Sephadex und die anschließende Entsalzung nach 4.2.3.2.3. an.

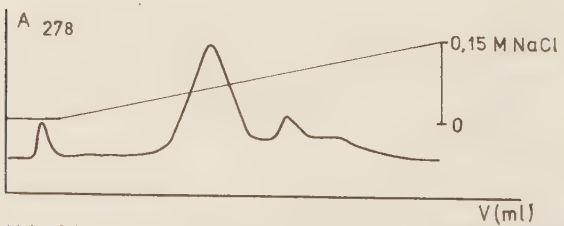

Abb.24: Reinigung von AlaB25-Ala(OMe)B27-DTrI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 5-7 mg AlaB25-Ala(OMe)B27-DTrI

Das gereinigte Produkt wurde nach 4.2.3.2.4. verseift, IP-gefällt, über Sephadex G50 fine gereinigt und lyophilisiert.
Ausbeute: 3-4 mg AlaB25-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.4. AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB26-AlaB27-DTrI)

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift 4.2.3.2.1. mit 56,2 mg Gly-Phe-Phe-Ala-Ala-OMexHCl (100 umol) gekuppelt. Die Auftrennung der Reaktionskomponenten, Debocylierung des rohen Kupplungsprodukts und die darauf folgende Gelchromatographie über Sephadex G50 fine erfolgte nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung 42-45 mg di-Boc-B27(OMe)-DTrI
(Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung 32-38 mg

Die weitere Reinigung erfolgte über DEAE-Sephadex A25 mit anschließender Entsalzung über Sephadex G50 fine (siehe 4.2.3.2.3.).

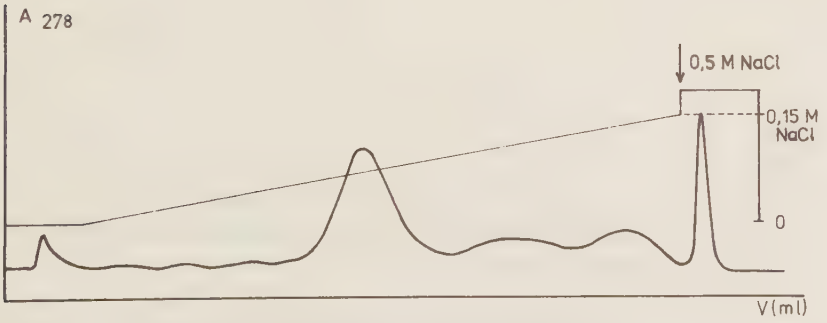

Abb.25: Reinigung von AlaB26-Ala(OMe)B27-DTrI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 11-14 mg AlaB26-Ala(OMe)B27-DTrI

Das Produkt wurde mit 0,1N NaOH nach 4.2.3.2.3 hydrolysiert und aufgearbeitet.

Ausbeute: 7-9 mg AlaB26-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäuranalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.5. AlaninB25-AlaninB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI)

Die Synthese erfolgte nach 4.2.3.2.1. aus 25 mg di-Boc-DOI (5 umol) und 24,3 mg Gly-Phe-Ala-Ala-Ala-OMexHCl (50 umol). Die Komponenten des Kupplungsansatzes wurden nach 4.2.3.2.2. getrennt, das Rohprodukt debocyliert und nach Reinigung über Sephadex G50 fine lyophilisiert.

Ausbeute: 1. Reinigung 20-22 mg di-Boc-Kupplungsprodukt. (Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung 16-18 mg

Das Rohprodukt wurde nach 4.2.3.2.3. über DEAE-Sephadex gereinigt und über Sephadex G50 fine entsalzt.

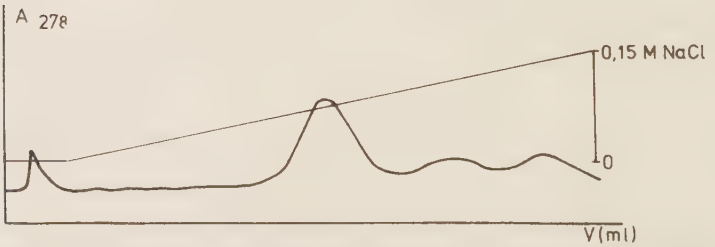

Abb.26: Trennung von AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI und DOI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 6-9 mg AlaB25-AlaB26-Ala(OMe)B27-DTrI

Die alkalische Hydrolyse und Aufarbeitung des Produkts erfolgte nach 4.2.3.2.4.

Ausbeute: 3-5 mg AlaB25-AlaB25-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.6. GlycinB24-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB24-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 50 mg di-Boc-DOI (10 umol und 56,4 mg Gly-Gly-Phe-Tyr-Ala-OMexHCl (100 umol) wurde nach 4.2.3.2.1. vorgenommen. Die Trennung der Reaktionspartner über Sephadex G50 fine, die Abspaltung der Boc-Gruppen und die nach folgende Gelfiltration erfolgten nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung 40-44 mg rohes Kupplungsprodukt
(Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung 29-32 mg

Die Separation von GlyB24-Ala(OMe)B27-DTrI und DOI erfolgte nach 4.2.3.2.3. über DEAE-Sephadex, die Entsalzung über Sephadex G50 fine.

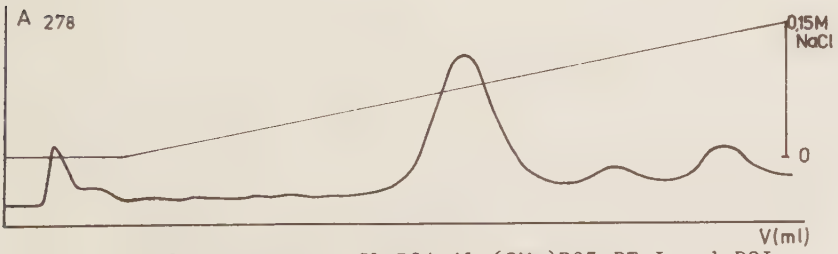

Abb.27: Auftrennung von GlyB24-Ala(OMe)B27-DTrI und DOI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 9-12 mg GlyB24-Ala(OMe)B27-DTrI

Das Produkt wurde aus seinem B27-Methylester nach 4.2.3.2.4 freigesetzt und aufgearbeitet.

Ausbeute: 6-8 mg GlyB24-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.7. GlycinB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB25-AlaB27-DTrI)

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) und 56,4 mg Gly-Phe-Gly-Tyr-Ala-OMexHCl (100 umol) wurden nach 4.2.3.2.1. umgesetzt. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, die Debocylierung des rohen Produkts und seine gelchromatographische Reinigung erfolgte nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung 41-43 mg bocyliertes Produkt (Kupplungsrate ca. 100%)
Debocylierung 27-30 mg

Der debocylierte B27-Methylester des Rohprodukts wurde nach 4.2.3.2.3. von ungekuppeltem DOI getrennt, die Fraktionen des gereinigten Derivates über Sephadex G50 fine entsalzt.

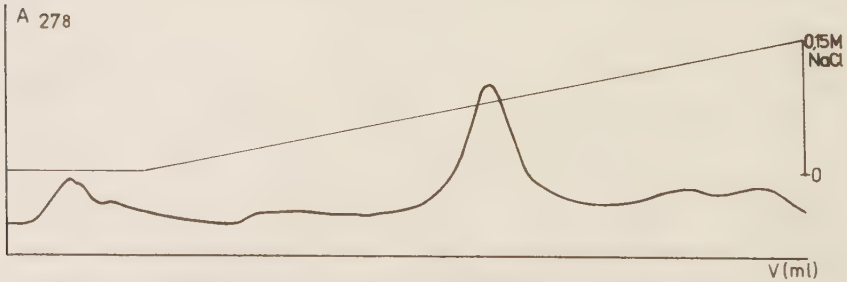

Abb.28: Trennung des GlyB25-Ala(OMe)B27-DTrI von DOI über DEAE-Sephadex A25

Der gereinigte Kupplungsprodukt-B27-Methylester wurde nach 4.2.3.2.4. alkalisch verseift und aufgearbeitet.

Ausbeute: 6-7 mg GlyB25-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.8. GlycinB24-GlycinB25-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI)

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) und 47,4 mg Gly-Gly-Gly-Tyr-Ala-OMexHCl (100umol) wurden nach 4.2.3.2.1. umgesetzt. Aufarbeitung, Debocylierung und Gelfiltration über Sephadex G50 fine erfolgten nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung: 32-38 mg bocyliertes Rohprodukt (Kupplungsrate ca. 50-60%)
Debocylierung: 25-28 mg

Die Trennung des gekuppelten Produkt-B27-Methylesters von DOI erfolgte nach 4.2.3.2.3. über DEAE-Sephadex A25, die anschließende Entsalzung über Sephadex G50 fine.

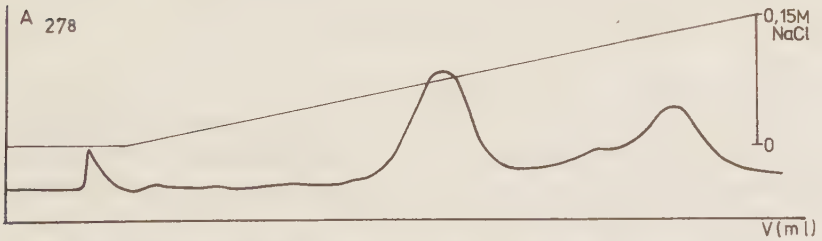

Abb.29: Trennung von GlyB24-GlyB25-Ala(OMe)B27-DTrI und DOI über DEAE-Sephadex A25

Die relative Ausbeute des Kupplungsproduktmethylesters war, verglichen mit DOI, um ca. 20% vermindert, während sich, wie auch die Ionenaustauschchromatographie zeigte, die Menge ungekuppelten DOI's vermehrte.

Ausbeute: 7-9 mg GlyB24-GlyB25-Ala(OMe)B27-DTrI

Die Hydrolyse des B27-Methylesters und Aufarbeitung des Endprodukts erfolgte nach 4.2.3.2.4.
Ausbeute: 4-5 mg GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate 95-100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

Da die Synthese bei pH 6,5 mit maximal 60% Kupplungsrate gelang, wurde die Kupplung bei pH 6,2 und pH 6,8 wiederholt, um zu klären, ob das pH-Optimum der Synthese für die Sequenz Gly-Gly-Gly-Tyr-Ala-OMe verschoben war. Bei pH 6,2 reduzierte sich die Kupplungsrate auf ca.40%, die Endausbeute auf 2-3,5 mg (4-7%), bei pH 6,8 auf 45-50% und die Endausbeute auf 3-4 mg (6-8%). In der DEAE-Sephadex-Ionenaustauschchromatographie änderten sich die Peaks von Kupplungsprodukt-B27-Methylester und DOI ihren Anteilen entsprechend. Aus diesen Resultaten konnte man schließen, daß die Glycin-reiche Sequenz des zu kuppelnden Pentapeptids die Kupplungsrate herabsetzte.

5.2.2.9. GlycinB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB26-AlaB27-DTrI)

Die Kupplung von 50 mg di-Boc-DOI (10 umol) mit 58,4 mg Gly-Phe-Phe-Gly-Ala-OMexHCl (100 umol) wurde nach 4.2.3.2.1. ausgeführt. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, die Debocylierung des Rohprodukts und seine Gewinnung in lyophilisierter Form erfolgte nach 4.2.3.2.2.
Ausbeute: 1. Reinigung: 43-45 mg bocyliertes Rohprodukt
(Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung: 35-38 mg

Die Trennung des GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI von DOI erfolgte nach 4.2.3.2.3. über DEAE-Sephadex A25, die Entsalzung der produkthaltigen Fraktionen über Sephadex G50 fine.

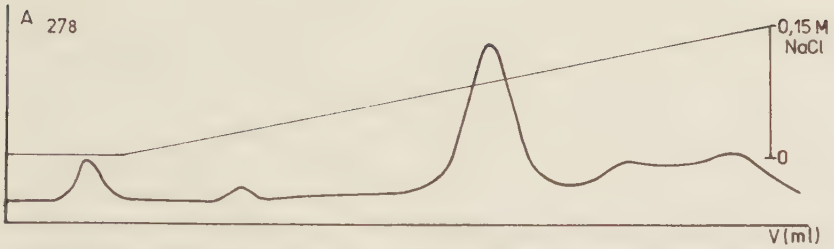

Abb.30: Auftrennung von GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI und DOI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 14-15 mg GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI

Die Hydrolyse der B27-Methylestergruppe des gereinigten Kupplungsprodukts und die Aufarbeitung des IP-gefällten Hydrolysats wurde nach 4.2.3.2.4. ausgeführt.

Ausbeute: 8-10 mg GlyB26-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäurezusammensetzung siehe 5.2.4.

5.2.2.10. GlycinB24-GlycinB26-AlaninB27-Destripeptidinsulin (GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI)

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) und 45,7 mg Gly-Gly-Phe-Gly-Ala-OMexHCl (100 umol) wurden nach 4.2.3.2.1. gekuppelt. Die Aufarbeitung des Kupplungsansatzes, die Abspaltung der Boc-Gruppen und die anschließende Reinigung über Sephadex G50 fine erfolgte nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1. Reinigung: 42-45 mg (di-Boc)-Rohprodukt
(Kupplungsrate ca. 60%)
Debocylierung: 33-36 mg

Die Trennung des gekuppelten Produkt-B27-Methylesters von DOI erfolgte nach 4.2.3.2.3. über DEAE-Sephadex A25, die Entsalzung der produkthaltigen Fraktionen über SephadexG50 fine.

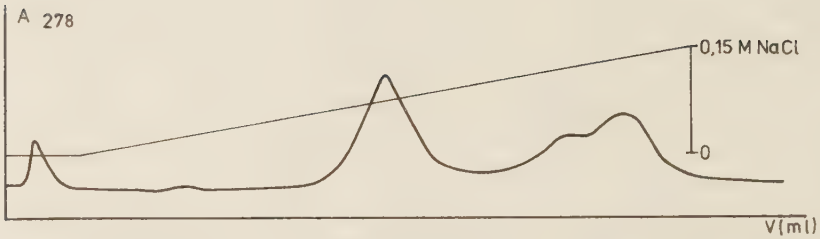

Abb.31: Auftrennung von GlyB24-GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI und DOI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 12-13 mg GlyB24-GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI

Das Produkt wurde nach 4.2.3.2.4. verseift und aufgearbeitet.

Ausbeute: 8-10 mg GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate: 95-100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.2.11. GlycinB25-GlycinB26-AlaninB27-Destripepetidinsulin (GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI)

50 mg di-Boc-DOI (10 umol) und 45,7 mg Gly-Phe-Gly-Gly-Ala-OMexHCl (100 umol) wurden nach 4.2.3.2.1. umgesetzt. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, die Abspaltung der Boc-Gruppen und die Gelfiltration des debocylierten Rohprodukts erfolgten nach 4.2.3.2.2.

Ausbeute: 1.Reinigung: 42-45 mg bocyliertes Rohprodukt (Kupplungsrate ca. 70%)
Debocylierung 33-37 mg

Das Kupplungsprodukt wurde von ungekuppeltem DOI über DEAE-Sephadex nach 4.2.3.2.3. getrennt und über Sephadex G50 fine entsalzt.

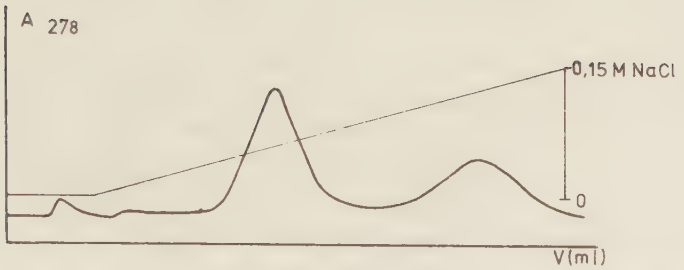

Abb.32: Trennung des GlyB25-GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI von DOI über DEAE-Sephadex A25

Ausbeute: 10-12 mg GlyB25-GlyB26-Ala(OMe)B27-DTrI

Die B27-Methylestergruppe des Kupplungsproduktes wurde nach 4.2.3.2.4. verseift und aufgearbeitet.
Ausbeute: 8-9 mg GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI

Kupplungsrate ca. 100%
Aminosäureanalyse siehe 5.2.4.

5.2.3. Elektrophorese der Kupplungsprodukte auf Celluloseacetat-Folien

Puffer I (0,06 M Veronal/Na-Veronal pH 8,8 in 4 M Harnstoff):

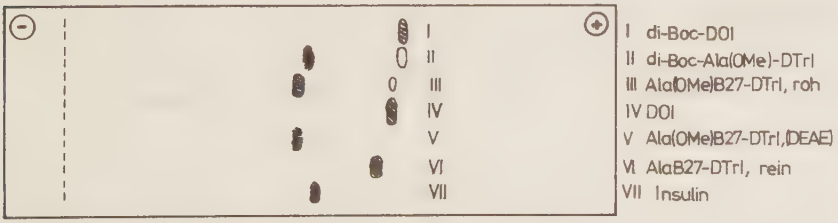

Abb.33: Elektropherogramm eines enzymatisch-semisynthetisch dargestellten Destripeptidinsulins am Beispiel des AlaninB27-Destripeptidinsulins (AlaB27-DTrI)

Puffer II (2,4 M Ameisensäure in 4 M Harnstoff):

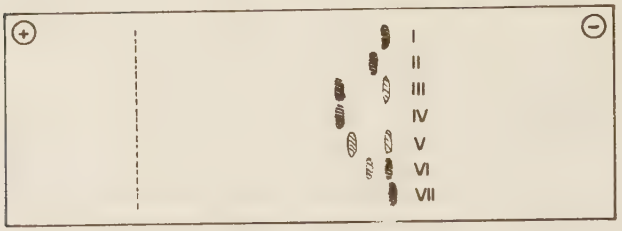

Abb.34: Elektropherogramm chemisch-semisynthetisch dargestellter Insuline: I: DOI, II: DOI(OMe)$_5$, III+IV: AlaB27-DTrI :5.2.1.1.1.+4.), V: AlaB26-AlaB27-DTrI, VI: AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI und VII: Insulin.

5.2.3.1. Analytische isoelektrische Focusierung auf 1 mm-Polyacrylamidgel (T5C3)

I: AlaB27-DTrI; 5.2.1.1.1. Teil I
II: " 5.2.1.1.1. Teil II
III: " 5.2.1.1.2.
IV: " 5.2.1.1.3.
V: " 5.2.1.1.4. Teil I
VI: " 5.2.1.1.4. TeilII
VII: Insulin
VIII: DOI
IX: IP-Eichprotein-Mischung

Abb.35: Analytische IEF des chemisch-semisynthetisch dargestellten AlaB27-Destripeptidinsulins (AlaB27-DTrI)

5.2.4. Aminosäureanalysen der semisynthetischen Insuline

Tab. 1: Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Varianten mit Alanin in den Positionen B24-26

5.2.1.1. AlaB27-DTrI
5.2.1.2. AlaB24-AlaB27-DTrI
5.2.1.3. AlaB25-AlaB27-DTrI
5.2.1.4. AlaB26-AlaB27-DTrI
5.2.1.5. AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI
(theoretische Werte in Klammern)

As.	5.2.1.1.	5.2.1.2.	5.2.1.3.	5.2.1.4.	5.2.1.5.
Asp	3,09 (3)	2,95 (3)	2,96 (3)	3,21 (3)	2,99 (3)
Thr	0,00 (0)	0,01 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,00 (0)
Ser	2,22 (3)	2,49 (3)	2,19 (3)	2,23 (3)	2,47 (3)
Glu	7,54 (7)	7,36 (7)	7,63 (7)	7,45 (7)	7,62 (7)
Pro	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
Gly	3,91 (4)	3,91 (4)	4,01 (4)	3,95 (4)	4,03 (4)
Ala	2,93 (3)	3,89 (4)	3,92 (4)	3,76 (4)	4,90 (5)
Cys	4,79 (6)	5,14 (6)	4,94 (6)	5,01 (6)	5,31 (6)
Val	4,55 (5)	4,66 (5)	4,75 (5)	4,57 (5)	4,64 (5)
Ile	0,75 (1)	0,77 (7)	0,81 (1)	0,76 (1)	0,73 (1)
Leu	5,88 (6)	5,89 (6)	5,95 (6)	5,79 (6)	6,01 (6)
Tyr	3.59 (4)	3,46 (4)	3,70 (4)	2,80 (3)	2,71 (3)
Phe	2,87 (3)	2,00 (2)	2,24 (2)	2,80 (3)	2,05 (2)
Lys	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
His	2,03 (2)	2,14 (2)	2,07 (2)	2,01 (2)	2,01 (2)
Arg	1,03 (1)	1,03 (1)	1,00 (1)	0,98 (1)	0,98 (1)

Bezugsaminosäuren: Asp + Leu + His = 11,00

Tab. 2: Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Analoga mit Glycin in B24 und B25

5.2.1.6. GlyB24-AlaB27-DTrI
5.2.1.7. GlyB25-AlaB27-DTrI
5.2.1.8. GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI
(4.2.1.3.1.) DOI
(theoretische Werte in Klammern)

As.	5.2.1.6.	5.2.1.7.	5.2.1.8.	4.2.1.3.1.
Asp	2,96 (3)	3,05 (3)	3,03 (3)	3,10 (3)
Thr	0,05 (0)	0,00 (0)	0,02 (0)	0,00 (0)
Ser	2,31 (3)	2,60 (3)	2,50 (0)	2,51 (3)
Glu	7,34 (7)	7,49 (7)	7,44 (7)	7,81 (7)
Pro	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
Gly	4,93 (5)	4,93 (5)	5,74 (6)	3,06 (3)
Ala	2,96 (3)	2,96 (3)	2,92 (3)	1,92 (2)
Cys	4,76 (6)	5,50 (6)	5,13 (6)	5,59 (6)
Val	4,71 (5)	4,62 (5)	4,67 (5)	4,41 (5)
Ile	0,80 (1)	0,72 (1)	0,73 (1)	0,70 (1)
Leu	5,95 (6)	5,95 (6)	5,92 (6)	5,97 (6)
Tyr	3,60 (4)	3,73 (4)	3,40 (4)	2,76 (3)
Phe	2,00 (2)	2,28 (2)	1,10 (1)	0,91 (1)
Lys	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
His	2,12 (2)	2,00 (2)	2,05 (2)	1,93 (2)
Arg	1,01 (1)	1,01 (1)	1,03 (1)	0,93 (1)

Bezugsaminosäuren: Asp + Leu + His = 11,00

Tab. 3: Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Insuline mit Glycin in B24-26 (TyrosinB26-frei)

5.2.1.9. GlyB26-AlaB27-DTrI
5.2.1.10. GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI
5.2.1.11. GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI
(theroretische Werte in Klammern)

As.	5.2.1.9.	5.2.1.10.	5.2.1.11.
Asp	3,03 (3)	3,02 (3)	3,01 (3)
Thr	0,02 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)
Ser	2,51 (3)	2,60 (3)	2,51 (3)
Glu	7,38 (7)	7,59 (7)	7.53 (7)
Pro	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
Gly	4,83 (6)	5,76 (6)	5,83 (6)
Ala	2,91 (3)	2,96 (3)	2,93 (3)
Cys	5,15 (6)	5,47 (6)	5,20 (6)
Val	4,70 (5)	4,71 (5)	4,74 (5)
Ile	0,72 (1)	0,77 (1)	0,79 (1)
Tyr	2,73 (3)	2,88 (3)	2,49 (3)
Phe	3,21 (3)	2,13 (2)	2,02 (2)
Lys	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)
His	2,07 (2)	1,99 (2)	2,06 (2)
Arg	1,00 (1)	0,96 (1)	1,01 (1)

Bezugsaminosäuren: Asp + Leu + His = 11,00

5.3. Biologische Aktivität der semisynthetischen Insuline

5.3.1. Glucoseoxidation an Fettzellen in vitro

5.3.1.1. Chemisch-semisynthetisch dargestellte Analoga

Tab. 4: Biologische Aktivität der chemisch-semisynthetisch erzeugten Insulinvarianten

Destripeptidinsulin	Biologische Aktivität (% ± SD) (Rinderinsulin = 100%)
AlaB27-DTrI (5.2.1.1.1.)	5 ± 1 (± 20 %)
" 5.2.1.1.2.	7 ± 1,1 (± 15,7%)
" 5.2.1.1.3.	‹0,2 ± 0,02 (› ± 10 %)
" 5.2.1.1.4.	15 ± 1,5 (± 10 %)
AlaB24-AlaB27-DTrI	0,2 ± 0,022 (± 11 %)
AlaB25-AlaB27-DTrI	3-4 ± 0,6 (± 20 %)
AlaB24-AlaB25-AlaB27-DTrI	‹0,1 ± 0,015 (± 15 %)
AlaB26-DTrI	5 ± 1 (± 20 %)
AlaB24-AlaB26-DTrI	0,15 ± 0,025 (± 16,7%)
AlaB25-AlaB26-DTrI	8-9 ± 2 (± 23,5%)

5.3.1.2. Enzymatisch-semisynthetisch dargestellte Analoga

Tab. 5: Biologische Aktivität der enzymatisch synthetisierten Destripeptidinsuline (Alanin in B24-26)

Destripeptidinsulin (5.2.2.1.- 5.)	Biologische Aktivität (% + SD) (Rinderinsulin = 100%)
AlaB27-DTrI	88,0 + 9,3 (+ 10,6 rel.%)
AlaB24-AlaB27-DTrI	0,7 + 0,13 (+ 18,6 %)
AlaB25-AlaB27-DTrI	8,3 + 1,1 (+ 13,2 %)
AlaB26-AlaB27-DTrI	97,0 + 9,9 (+ 10,2 %)
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	27,1 + 2,9 (+ 10,7 %)
(Desoctapeptidinsulin (DOI)	0,1 + 0,02 (+ 20,0 %))

Siehe Abb.36 (S. 82).

Tab. 6: Biologische Aktivität der enzymatisch synthetisierten Destripeptidinsuline (Glycin in B24-26)

Destripeptidinsulin (5.2.2.6.- 11.)	Biologische Aktivität (% + SD) (Rinderinsulin = 100%)
GlyB24-AlaB27-DTrI	17,9 + 1,7 (+ 9,5 rel.%)
GlyB25-AlaB27-DTrI	0,95 + 0,05 (+ 5,3 %)
GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI	0,4 + 0,08 (+ 20,0 %)
GlyB26-AlaB27-DTrI	80,5 + 5,5 (+ 6,8 %)
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	1,0 + 0,05 (+ 5,0 %)
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	3,4 + 0,35 (+ 10,3 %)

Siehe Abb.37 (S. 83).

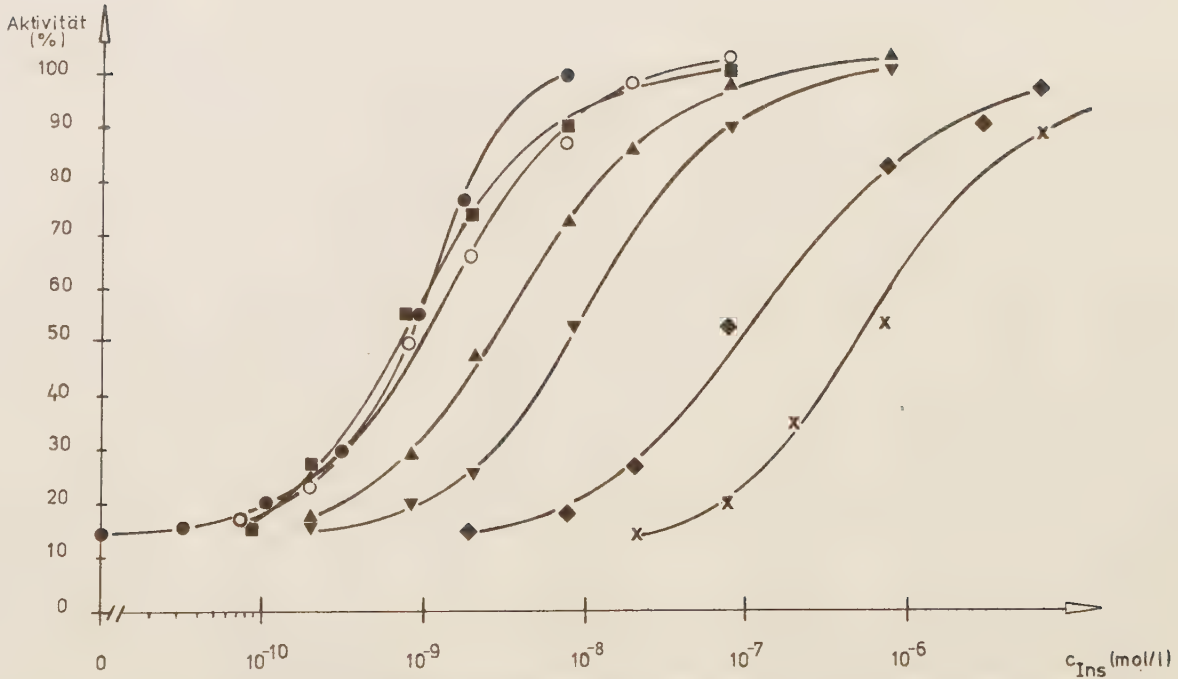

Abb.36: Biologische Aktivität der enzymatisch synthetisierten Destripeptidinsuline (Alanin in B24-26) in der Glucoseoxidation an Fettzellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus minimal drei Experimenten (Standardabw. d. Einzelmeß. ‹5%). Insulin (●), AlaB27-DTrI (○), AlaB24-AlaB27-DTrI (◆), AlaB25-AlaB27-DTrI (▼), AlaB26-AlaB27-DTrI (■), AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI (▲), DOI (x).

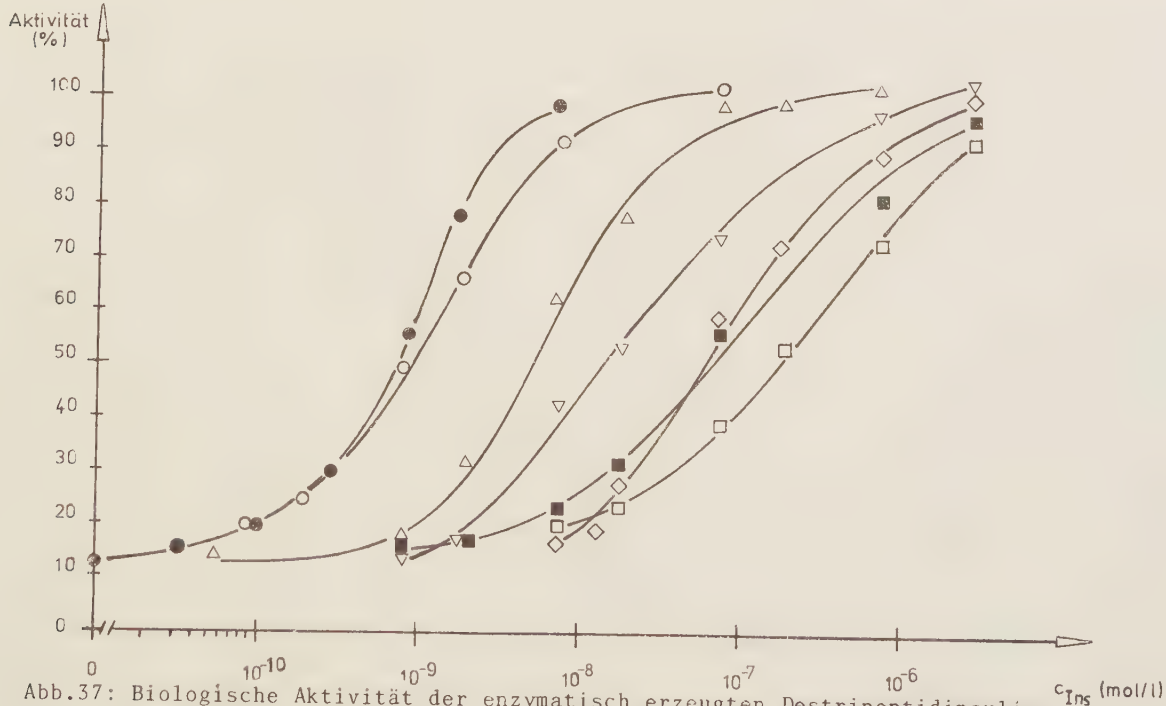

Abb.37: Biologische Aktivität der enzymatisch erzeugten Destripeptidinsuline (Glycin in B24-26) in der Glucoseoxidation der Fettzellen. (Siehe auch Abb.36). Insulin (●), GlyB24-AlaB27-DTrI (△), GlyB25-AlaB27-DTrI (■), GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI (□), GlyB26-AlaB27-DTrI (○), Gly-B24-GlyB26-AlaB27-DTrI (◇), GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI (▽).

5.3.2. Bindungseigenschaften der enzymatisch-semisynthetisch dargestellten Insulinderivate im 125-J-Rinderinsulin-Verdrängungstest an Rattenleber-Plasmamembranen(54-58)

Tab. 7: Rezeptoraffinität der Destripeptidinsuline (Alanin in B24-26) (Siehe Abb.38 (S. 85))

Destripeptidinsulin	relative Bindung (%) (Rinderinsulin = 100%)
AlaB27-DTrI	170 - 190
AlaB24-AlaB27-DTrI	6 - 7
AlaB25-AlaB27-DTrI	18 - 19
AlaB26-AlaB27-DTrI	165 - 180
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	75 - 80

Tab. 8: Rezeptoraffinität der Destripeptidinsuline (Glycin in B24-26) (Siehe Abb.39 (S. 86))

Destripeptidinsulin	relative Bindung (%) (Rinderinsulin = 100%)
GlyB24-AlaB27-DTrI	90 - 100
GlyB25-AlaB27-DTrI	12 - 15
GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI	2 - 3
GlyB26-AlaB27-DTrI	190 - 210
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	10 - 12
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	30 - 50

Die Standardabweichung der Einzelmeßungen war kleiner als 0,5%. Die in den Tabellen 7 und 8 angeführten relativen Bindungswerte der Insulinderivate spiegelten die Schwankungsbreite der Lage der Verdrängungskurven der einzelnen Analoga zur Rinderinsulin-Verdrängungskurve wider. Diese war auf die Abhängigkeit der spezifischen 125J-Insulinbindung vom Alter des eingesetzten 125J-Insulins zurückzuführen,dessen Verdrängungskurven sich bei zunehmender Lagerungsdauer nach höheren Konzentrationen verschoben.

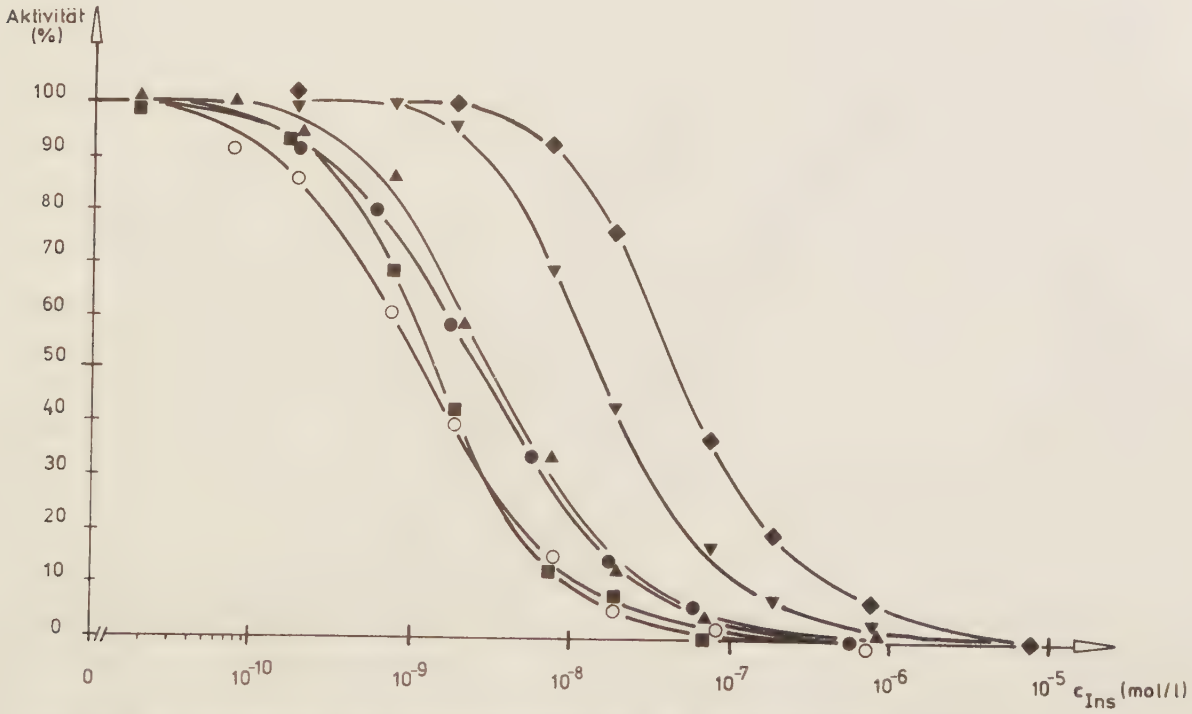

Abb.38: 125J-Rinderinsulin-Verdrängungskurven der Destripeptidinsuline (Alanin in B24-26): Insulin (●), AlaB27-DTrI (○), AlaB24-AlaB27-DTrI (◆), AlaB25-AlaB27-DTrI (▲), AlaB26-AlaB27-DTrI (■), AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI (▼).

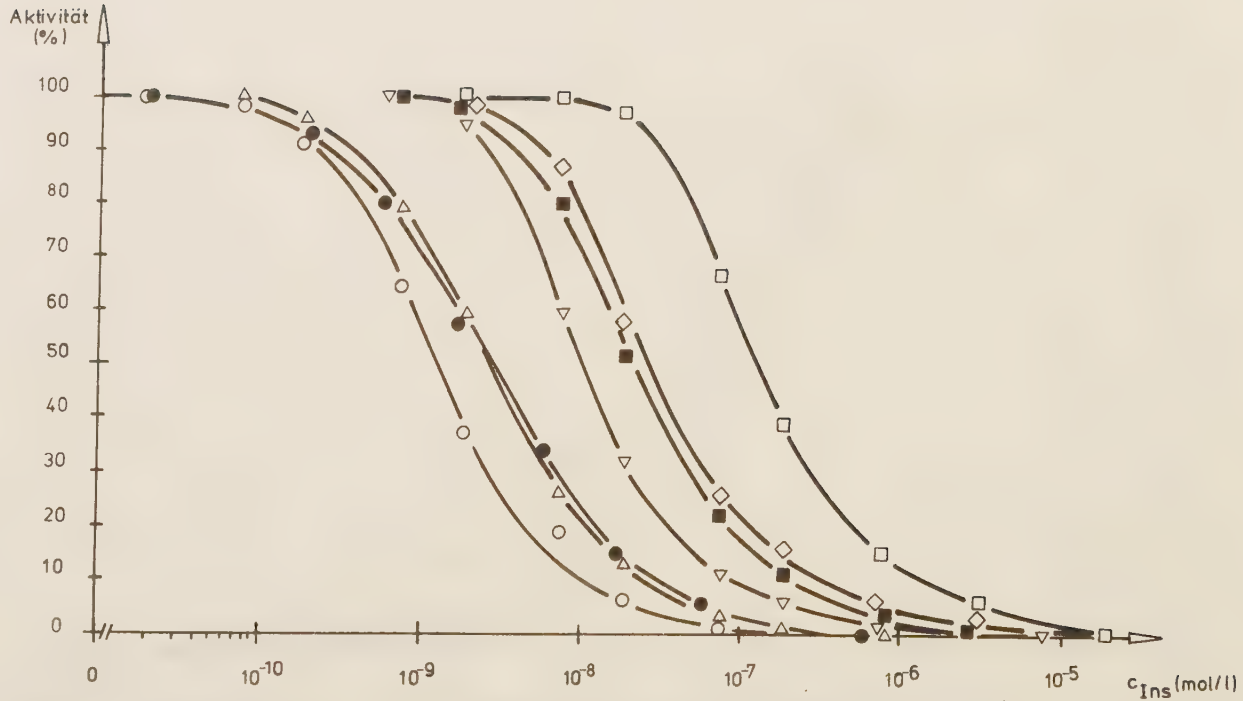

Abb.39: 125J-Rinderinsulin-Verdrängungskurven der Destripeptidinsuline (Glycin in B24-26): Insulin (●), GlyB24-AlaB27-DTrI (△), GlyB25-AlaB27-DTrI, (■) GlyB24-GlyB25-Ala-B27-DTrI (□), GlyB26-AlaB27-DTrI (○), GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI (◇), GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI (▽).

5.3.3. Antigene Eigenschaften der enzymatisch dargestellten Insuline (61)

Tab. 9: Affinität der Destripeptidinsuline (Alanin in B24-26) zum Antiinsulin-Antikörper des Meerschweinchens

Destripeptidinsulin	Antikörperbindung (%) (Rinderinsulin = 100%)
AlaB27-DTrI	60 - 70
AlaB24-AlaB27-DTrI	10 - 20
AlaB25-AlaB22-DTrI	20 - 30
AlaB26-AlaB27-DTrI	40 - 50
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	20 - 25

Siehe Abb.40 (S. 88).

Tab.10: Affinität der Destripeptidinsuline (Glycin in B24-26)

Destripeptidinsulin	Antikörperbindung (%) (Rinderinsulin = 100%)
GlyB24-AlaB27-DTrI	10 - 15
GlyB25-AlaB27-DTrI	20 - 25
GlyB24-AlaB25-AlaB27-DTrI	4 - 6
GlyB26-AlaB27-DTrI	45 - 55
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	5 - 10
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	20 - 25

Siehe Abb.41 (S. 89).

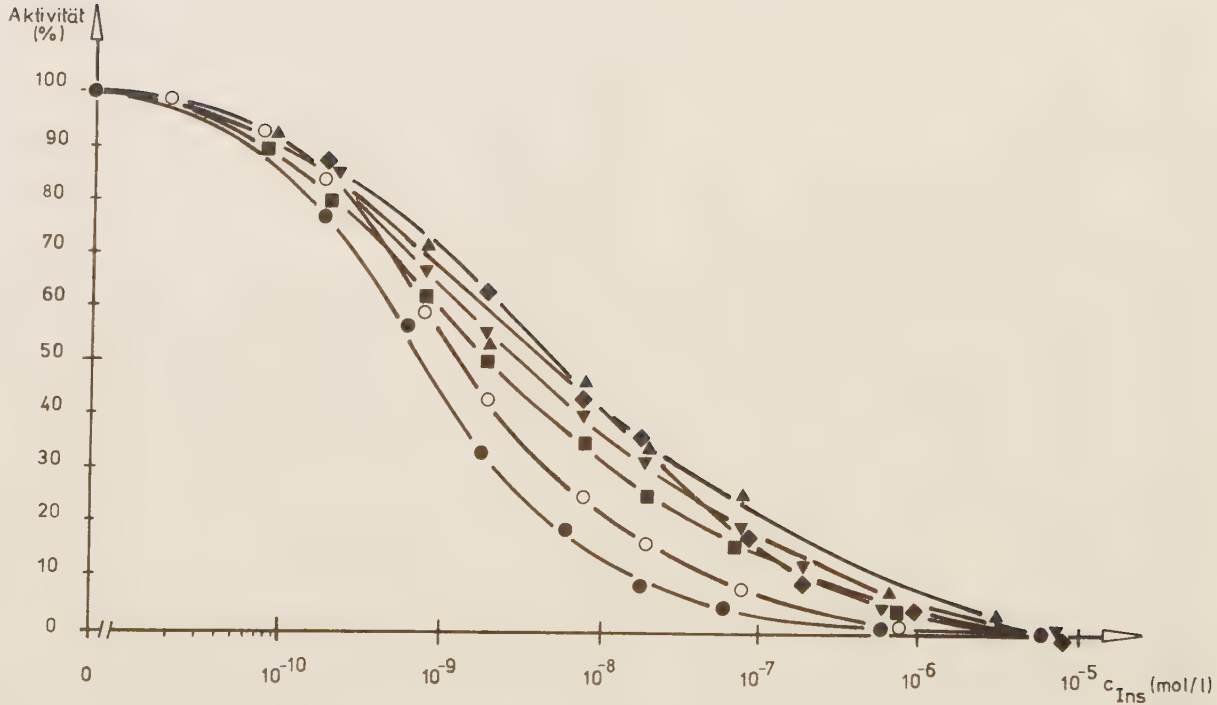

Abb.40: Affinität der Destripeptidinsuline zum Anti-Schweineinsulin-Antikörper (Meerschweinchen): Insulin (●), AlaB27-DTrI (○), AlaB24-AlaB27-DTrI (◆), AlaB25-AlaB27-DTrI (▲), AlaB26-AlaB27-DTrI (■), AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI (▼).

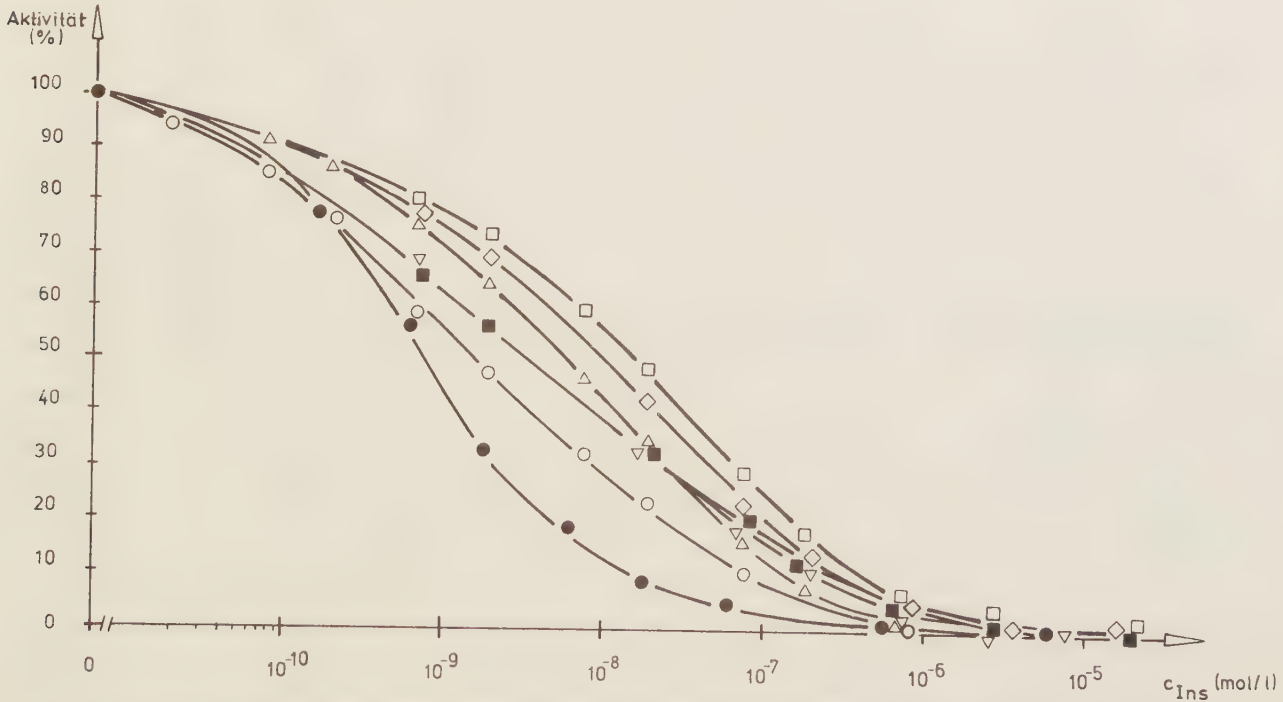

Abb.41: Affinität der Destripeptidinsuline zum Antikörper (siehe auch Abb.40): Insulin (●), GlyB24-AlaB27-DTrI (△), GlyB25-AlaB27-DTrI (■), GlyB24-GlyB25-AlaB27DTrI (□), GlyB26-AlaB27-DTrI (○), GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI (◇), GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI (▽).

5.3.4. Wirkung der enzymatisch synthetisierten Insuline in vivo an NMRI-Mäusen

5.3.4.1. Blutzuckersenkung

Tab.11 (S.90-92): Dosisabhängige Senkung der Blutglucose

Insulinderivat	Dosis (ug/Tier)	Blutglucose (mg/dl ±SD)	n Anzahl d. Tiere
Rinderinsulin	0,5	66,7 ± 7,3	4
	1	56,4 ± 6,2	4
	2	45,7 ± 7,9	65
	5	31,7 ± 5,0	3
	10	20,8 ± 5,4	3
Kontrolle	-	81,9 ± 12,3	65
AlaB27-DTrI	0,5	60,6 ± 9,9	6
	1	62,1 ± 7,0	6
	2	54,8 ± 7,6	6
	5	37,1 ± 5,3	6
	10	24,8 ± 4,4	6
AlaB24-AlaB27-DTrI	1	87,0 ± 6,7	6
	2	74,8 ± 4,0	6
	5	73,1 ± 0,7	6
	10	49,8 ± 3,0	6
	25	35,4 ± 7,2	6
AlaB25-AlaB27-DTrI	1	79,8 ± 8,9	6
	2	65,5 ± 6,0	3
	5	49,6 ± 3,6	6
	10	26,8 ± 3,1	6

Insulinderivat	Dosis (ug/Tier)	Blutglucose (mg/dl ±SD)	n Anzahl d. Tiere
AlaB26-AlaB27-DTrI	0,5	92,0 ± 1,7	3
	1	56,8 ± 4,4	6
	2	51,2 ± 7,4	6
	5	33,3 ± 5,4	6
	10	27,9 ± 6,5	6
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	0,5	74,9 ± 7,3	6
	1	60,2 ± 5,5	6
	2	47,1 ± 8,2	6
	5	32,0 ± 2,8	6
	10	24,1 ± 2,8	6
GlyB24-AlaB27-DTrI	0,5	71,6 ± 5,2	3
	1	67,0 ± 7,8	6
	2	56,2 ± 6,2	6
	5	39,8 ± 3,5	6
	10	38,0 ± 3,4	6
	20	31,4 + 0,7	3
GlyB25-AlaB27-DTrI	1	68,5 ± 9,3	9
	2	66,5 ± 7,4	6
	5	47,9 ± 5,0	9
	10	27,6 ± 3,8	9
	25	32,6 ± 6,8	6
GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI	1	87,7 ± 6,8	6
	10	82,8 ± 6,7	6
	25	76,6 ± 7,7	6
	50	63,6 ± 9,6	6
GlyB26-AlaB27-DTrI	0,5	66,3 ± 2,5	6
	1	63,5 ± 2,5	6
	2	55,1 ± 6,3	6
	5	26,0 ± 2,8	6
	10	21,0 ± 4,7	6

Insulinderivat	Dosis (ug/Tier)	Blutglucose (mg/dl ±SD)	n Anzahl d. Tiere
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	1	68,5 ± 3,4	9
	2	59,4 ± 4,0	6
	5	58,9 ± 2,5	6
	10	55,6 ± 4,6	9
	25	46,4 ± 1,7	9
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	0,5	78,2 ± 6,7	3
	1	69,9 + 4,0	6
	2	53,7 ± 3,2	6
	5	37,3 ± 3,3	6
	10	31,3 ± 3,7	6

Tab.12: Relative Aktivität der enzymatisch synthetisierten Derivate in der Blutzuckersenkung

Insulinderivat	Aktivität (%)
Rinderinsulin	100%
AlaB27-DTrI	ca. 100%
AlaB24-AlaB27-DTrI	‹20%
AlaB25-AlaB27-DTrI	30-40%
AlaB26-AlaB27-DTrI	ca. 100%
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	ca. 100%
GlyB24-AlaB27-DTrI	80-90%
GlyB25-AlaB27-DTrI	ca. 40%
GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI	‹4%
GlyB26-AlaB27-DTrI	ca. 100%
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	20-30%
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	‹50%

5.3.4.2. Einbau von U-14C-Glucose in Zwerchfell und Nebenhodenfettgewebe der Maus

Tab.13: Relative Einbauaktivität der enzymatisch dargestellten Destripeptidinsuline in Zwerchfell und epididymales Fettgewebe

Derivat	Zwerchfell (% der Rinderinsulinaktivität)	Fettgewebe (% der Rinderinsulinaktivität)
Rinderinsulin	100%	100%
AlaB27-DTrI	ca. 100%	ca. 100%
AlaB24-AlaB27-DTrI	5-10%	<20%
AlaB25-AlaB27-DTrI	ca. 50%	80-100%
AlaB26-AlaB27-DTrI	ca. 100%	ca. 100%
AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI	50-80%	80-100%
GlyB24-AlaB27-DTrI	50-80%	ca. 100%
GlyB25-AlaB27-DTrI	ca. 40%	ca. 100%
GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI	<1%	10-20%
GlyB26-AlaB27-DTrI	ca. 100%	ca. 100%
GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI	20-30%	20-40%
GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI	<50%	80-100%

Die relativen Standardabweichungen der Einzelmeßungen lagen aufgrund der niedrigen Versuchstierzahlen bei 10-15%, in Einzelfällen bei 20-30 %. Daher wurden die Meßergebnisse mit Abstufungen von 10% angegeben.

6. Diskussion

Die Sequenz der aromatischen Aminosäuren Phe-Phe-Tyr (B24-26) hat für die Insulinaktivität sehr große Bedeutung. Früher hatte man sie als Teil des "aktiven Zentrums" betrachtet (1). Mehrere Arbeiten (13,14-20,22-28) weisen inzwischen darauf hin, daß sie lediglich an der Verstärkung der Insulinwirkung beteiligt ist.

Nachdem Weitzel et al. (5) die verstärkende Wirkung in vivo als dreistufigen Aktivitätsanstieg bei sukzessiver Verlängerung von Desoctapeptidinsulin mit Gly-B23 und den Aromaten B24-26 nachgewiesen hatten, was von Riemen et al. (28) später in vitro bestätigt wurde, stellte sich heraus, daß die C-terminalen Aminosäuren Phe-B25 und Tyr-B26 dieser verkürzten Insuline, ohne Wirkungsverlust durch Alanin ersetzt und mit Ala-B27 C-terminal nahezu volle Insulinaktivität erreicht werden konnten (5). Der C-terminale Austausch ohne Aktivitätsverlust einerseits, die Befunde mehrerer Arbeitsgruppen (14-20,22-26,28) andererseits, die die besondere Bedeutung der beiden Phenylalanine in B24 und B25 hervorhoben, aber nicht eindeutig klären konnten, welcher Stellenwert ihnen im Einzelnen zukam, warfen die Frage auf,inwieweit spezifische Eigenschaften der Aminosäuren B24-26 und ihr Zusammenwirken als Gesamtkomplex, Kettenlänge und hydrophobe Eigenschaften dieses Insulinabschnitts seine Verstärkerfunktion beeinflußen.

Zur Klärung dieser Frage wurden um die Aminosäuren B28-30 verkürzte Destripeptidinsuline mit Alanin am Carboxylende B27 nach der Methode von Weitzel et al. (5), die auf Ruttenberg (71) zurückgeht und nach der Methode von Inouye et al.(19,21) semisynthetisch dargestellt und in verschiedenen Testsystemen auf ihre biologischen Wirkungen überprüft.

6.1. Präparativer Teil

6.1.1. Bocyliertes Desoctapeptidinsulin (di-Boc-DOI) und dessen Pentamethylester (di-Boc-DOI$(OMe)_5$)

DOI wurde aus Zn-freiem Insulin (37), DOI$(OMe)_5$ nach Veresterung von Zn-freiem Insulin mit Bortrifluorid in Methanol (39) aus Insulinhexamethylester mit Trypsin nach der bewährten Methode von Young & Carpenter (3) freigesetzt. DOI befreite man am SP-Sephadex-Ionenaustauscher von Resten ungespaltenen Insulins; DOI$(OMe)_5$ wurde nach Weitzel et al. (5) durch mehrfaches Rechromatographieren über Sephadex G50 fine von unverdautem Ausgangsprodukt befreit.

Die gereinigten Spaltprodukte wurden nach Levy & Carpenter (40) t-Boc-geschützt. Die Blockierung der N-terminalen Aminogruppen A1 und B1 mit der t.-Boc-Gruppe war voll reversibel und wurde mit Trifluoressigsäure aufgehoben.

6.1.2. Synthese der anzukuppelnden Pentapeptide

Sie wurden nach den klassischen Methoden der Peptidchemie synthetisiert. Man baute N-t.-Boc-geschützte Dipeptide und an der Carboxylfunktion Methylester-geschützte Tripeptide auf, die über Fragmentkondensation mit DCC/HOBt zu den gewünschten Pentapeptiden vereinigt wurden. Diese Synthesestrategie nützte die unterschiedlichen Löslichkeiten von Ausgangs- und Endprodukten: Die schwerer löslichen Endprodukte wurden durch simples Auskochen mit Methanol von den leichter löslichen Di- und Tripeptiden abgetrennt. Auf diese Weise gewann man sehr reine Pentapeptide in geschützter Form.

Zur Semisynthese entfernte man die Boc-Gruppe und gegebenenfalls die O-Bzl-Gruppe der phenolischen Tyrosin-Hydroxylgruppe und setzte die Peptide als Hydrochloride ihrer Methylester ein.

6.1.3. Semisynthese und Aufarbeitung der Kupplungsprodukte

6.1.3.1 Chemische Kupplung (5) mit DCC/HNSu und Reinigung der Syntheseprodukte

Die Semisynthese der gewünschten Insulinderivate mit Hilfe der klassischen Reagentien der Peptidsynthese DCC und HOSu erwies sich als problematisch. Die Kupplung, eine Form der Fragmentkondesation, verlief aufgrund der Größe der beteiligten Reaktionspartner, di-t.-Boc-DOI$(OMe)_5$ und Pentapeptidmethylesterhydrochlorid, nicht vollständig (47). Abhängig vom eingesetzten Peptid erzielte man Kupplungsraten zwischen 40% und ca.70%.

Das Rohprodukt konnte nach Entfernung der t-Boc-Schutzgruppen auf nur wenigen verschiedenen Wegen aufgearbeitet werden. Keine der Methoden erbrachte jedoch zufriedenstellende Resultate. Die zwei Hauptschwierigkeiten lagen zum einen bei der Trennung des Kupplungsprodukts von ungekuppeltem DOI, zum andern bei der Verseifung der Methoxylgruppen des veresterten Derivates.

Die Anreicherung des Kupplungsprodukts gelang nur beim AlaB27-Destripeptidinsulin, das die vollständige Aromatensequenz Phe-Phe-Tyr (B24-26) enthielt. Es neigte bei der gelchromatographischen Reinigung über Sephadex G50 fine im schwach alkalischen Milieu (pH 8,0) zu unsymmetrischer Verteilung im Elutionspeak, erschien als flach auslaufender Schwanz im Elutionsdiagramm und konnte so in hoher Anreicherung entnommen werden. Die anderen variierten Insulinderivate konnten nur in ihren Kupplungsraten entsprechenden Reinheitsgraden erhalten werden.

Die Verseifung der Kupplungsprodukt-Methylester war von nicht unerheblichen Nebenreaktionen begleitet. Zwar waren im verseiften Derivat keine Methoxylgruppen mehr nachzuweisen, doch konnte man mit analytischer isoelektrischer Focusierung zeigten, daß im 45 min. lang mit 0,1 N NaOH hydrolysierten Produkt Nebenprodukte in hohem, ca. 60-70%igem Anteil ent-

halten waren,die eine freie Carboxylgruppe weniger als erwartet besaßen. Diese Nebenprodukte traten zwar bei Hydrolyse über 15 h bei 4°C (pH 11,8), wie sie von Weitzel et al. (5) angewandt worden war, nicht mehr auf, dafür erschienen in der analytischen IEF zahlreiche Banden bei niedrigeren pH-Werten als dem IP der Produktbande, was auf Desamidierungen während der langen Verseifungsdauer schließen ließ.

Offensichtlich entstanden die Nebenprodukte bevorzugt im alkalischen Milieu, wo die Verseifung des α-Methylesters der C-terminalen A-Ketten-Aminosäure, Asn-A21, zur Zyklisierung mit der ß-Säureamid-Funktion führen konnte(49). Wie Gattner & Schmitt(49) berichteten, trat diese Nebenreaktion bei Verseifung des Insulinhexamethylesters mit NaOH in hohem Prozentsatz auf und führte zu A21-Asparaginimid-Insulin, das eine blockierte Carboxylgruppe enthielt. Der isoelektrische Punkt des A21-Asn-Imid-Insulins, lag nach der IEF ca. 1-1,5 pH-Einheiten höher als der Insulin-IP (49). Diese IP-Verschiebung entsprach den beobachteten Abweichungen der Nebenproduktbanden von der Bande der semisynthetischen Hauptprodukte. Da die Verseifung der dargestellten Insuline nach Gattner & Schmitt (49) vorgenommen worden war, mußte man annehmen, daß als Nebenprodukte überwiegend die A21-Asn-Imid-Formen der gewünschten Produkte entstanden waren. Daneben traten desamidierte Formen in geringen Anteilen auf.

Bei Hydrolyse über 15 h bei pH 11,8 (5) entstand über die zyklisierte Zwischenstufe aus dem relativ alkalilabilen A21-Aminosuccinimid ein Gemisch aus A21-Asn- und A21-Iso-Asn-Derivat (5,49,72), dessen biologische Wirkung zwar in vivo nach Weitzel et al. (5,72) wenig vom reinen A21-Asn-Derivat verschieden zu sein schien, das aber zahlreiche Desamidierungen über die lange Reaktionsdauer hinweg erlitt, was, wie die biologischen Bestimmungen der vorliegenden Arbeit zeigten, offensichtlich starke Aktivitätsminderungen in vitro bewirkte.

6.1.3.2. Enzymatische Semisynthese und Reinigung der gekuppelten Produkte

Da die chemisch-semisynthetisch erzeugten Insulinderivate uneinheitlich waren und auch von Synthese zu Synthese stark schwankende Qualität zeigten, wurde als Alternative, um zu reineren Produkten zu gelangen, die enzymatische Semisynthese erprobt.

Diese Methode ging auf Inouye et al. (21) zurück, die die Entdeckung von Ingalls et al. (73), Butlers et al. (74) und Laskowskis (75), daß organische Lösungsmittelzusätze in wäßrigen Lösungen bzw. Wasserentzug mit organischen Solventien enzymatische Reaktionen umzukehren vermochten, zur Insulinsynthese mit Trypsin erfolgreich angewandt hatten. Mehrere Arbeitsgruppen griffen diese Idee auf (16-20,22,23,25,28) und synthetisierten damit verschiedene Insuline mit Variationen der C-terminalen B-Kette.

Zur Ausführung der Synthesen wurde die verbesserte Variante von Inouye et al. (19) verwendet. Die Trypsin-katalysierte Kupplung von di-Boc-DOI mit den Pentapeptidmethylestern verlief in DMF/1,4-Butandiol/Wasser bei pH 6,5 optimal. Die Kupplungsrate betrug in der Regel ca. 70%. Anzukuppelnde Peptide mit mehreren Glycinresten reduzierten sie auf 50-60%. Änderungen des pH und der Lösungsmittelzusammensetzung beeinflußten sie ebenfalls negativ, wie auch Inouye et al. (19,21) berichteten.

Die Aufarbeitung der Reaktionsansätze war problemlos. Man beendete die enzymatische Reaktion durch Ansäuern und trennte die Reaktionsprodukte direkt gelchromatographisch über Sephadex G50 fine. Auf diese Weise erhielt man bereits in der Rohform von Nebenprodukten, Trypsin und überschüßigem Pentapeptid befreite bocylierte Insuline, die nur noch den dem Reaktionsgleichgewicht entsprechenden Anteil von ungekuppeltem di-Boc-DOI enthielten, mit 70-80% Ausbeute. Das debocylierte Rohprodukt, als Alanin-B27-Methylester vorliegend, wurde nach Cui et al. (38) am DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher vollständig von anhaftendem DOI befreit. Dieser Schritt war mit größeren

Ausbeuteverlusten verbunden, da mehr als 50% des eingesetzten Materials unspezifisch an die Austauschermatrix adsorbierte und von dort auch mit hohen Ionenstärken nur wenig wieder eluiert werden konnte. Die Verseifung des Methylesters der Ala-B27-Carboxylgruppe gelang schonend bei 45 min. Behandlung in 0,1N NaOH/10°C (48,70). Es traten dabei nur wenig Polymere und andere Nebenprodukte auf, die leicht gelchromatographisch zu entfernen waren. Die Endausbeuten der einzelnen Synthesen lagen zwischen 10 und 20% des eingesetzten Ausgangsprodukts.

6.1.3.3. Reinheitskriterien

Die Reinheit der Produkte wurde in erster Linie aus den Ergebnissen der Aminosäureanalysen ermittelt. Sie dienten auch zur genauen Bestimmung der Kupplungsraten.

Als weiteres Kriterium prüfte man die elektrophoretische Mobilität der Syntheseprodukte auf Celluloseacetat-Folie. Die Auftrennung der Derivate nach Ladung und Molekülgröße war auf der Trägerfolie so gut, daß klar zwischen ungeschützten, partiell und ganz geschützten, gekuppelten und ungekuppelten Insulinderivaten, teilweise auch zwischen den verschiedenen Derivate untereinander, differenziert werden konnte.

Die chemisch-semisynthetisch dargestellten Derivate wurden nach der Verseifung ihrer Methylestergruppen zusätzlich mit der analytischen isoelektrischen Focusierung auf Änderungen der Anzahl geladener funktioneller Gruppen untersucht.

6.2. Biologischer Teil

Will man den Einfluß von Modifikationen der Insulinsequenz auf die Wirkungen des Hormons genau erfassen, ist es notwendig, das veränderte Insulin eingehenden biologischen Prüfungen zu unterwerfen. Die biologischen Wirkungen des Insulins

sind jedoch vielfältig. Als anaboles Hormon wirkt es vor allem fördernd auf den Glucosestoffwechsel, die Lipidspeicherung, den Aminosäure- und Ionentransport des Organismus. Nicht alle verschiedenen Wirkungen sind aber für Messungen leicht zugänglich. Insbesondere sind Langzeiteffekte nur schwer quantitativ zu beurteilen, während die Kurzzeitwirkungen besser erfaßbar sind.

6.2.1. Testsysteme

Lange Zeit waren der Mäusefall- und Mäusekrampf-Test (76) die einzigen Aktivitätstests, die zur Verfügung standen. Meßparameter waren dabei sichtbare Muskelschwächen der Tiere, die durch hypoglycämische Zustände aufgrund von Gaben insulinwirksamer Substanz ausgelöst wurden. Mit Hilfe großer Versuchstierzahlen konnten diese Tests statistisch ausgewertet werden. Daneben ermittelte man die blutzuckersenkenden Eigenschaften der zu prüfenden Substanz.

Die In vivo-Tests hatten jedoch die Nachteile, daß man zum einen Metabolisierungen der Testsubstanzen nie ausschließen konnte, man daher die Aktivität der Metaboliten stets mitbestimmte, sie zum andern keine organspezifischen Aussagen erlaubten. Die Meßresultate streuten zudem stark wegen der individuellen Unterschiede der einzelnen Versuchstiere. Dennoch konnte man nicht auf sie verzichten, da sie Auskunft über Wirkungen am ganzen Organismus gaben.

Bestimmungen der Aktivität in In vitro-Testsystemen erlaubten wesentlich genauere Untersuchungen einzelner spezifischer Insulinwirkungen. Daher wurden die Insulinderivate der vorliegenden Arbeit in erster Linie in vitro getestet; In vivo-Tests wurden ergänzend durchgeführt.

6.2.1.1. Glucoseoxidation an isolierten Fettzellen

Epididymales Fettgewebe, das bekanntlich auf Insulin sehr empfindlich reagiert, ist für Aktivitätsprüfungen sehr geeignet. Verdaut man das Gewebe mit Kollagenase (50), so kann man daraus leicht isolierte Fettzellen gewinnen. Individuelle Unterschiede einzelner Tiere werden durch Verdauung der Nebenhodenfettkörper mehrerer Tiere zusammen ausgeglichen.

Mit den verschiedenen Testvarianten können beispielsweise Glucoseaufnahme, Glucoseoxidation, Lipogenese oder Antilipolyse der Adipocyten in Abhängigkeit vom Insulin quantitativ ermittelt werden (50,53,77-79).

Die biologische Aktivität der neu dargestellten Insulinderivate wurde in der Glucoseoxidation, einem zentralen Stoffwechselweg der Fettzelle, bestimmt. Sie setzte die Glucoseaufnahme voraus und stellte die zur Lipidbiosynthese notwendigen Acetyl-S-CoA-Körper und ATP-Energieäquivalente bereit. Das Meßsignal, die Produktion radioaktiv markierten Kohlendioxids aus 1-14C-Glucose, war wegen seiner Empfindlichkeit gegenüber kleinen Änderungen der Insulinkonzentration sehr zur Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen geeignet. Verfälschungen der Meßwerte durch passagere Metabolisierungen, wie sie in vivo vorkommen konnten, waren im Fettzell-Test weitgehend auf zellgebundene Veränderungen und Insulin-Abbau reduziert. Sie gingen unter den reproduzierbaren Testbedingungen als Konstanten in die Ergebnisse ein.

6.2.1.2. Bindung an den Insulinrezeptor isolierter Plasmamembranen aus Rattenleber

Die Fähigkeit der dargestellten Insulinanaloga zur spezifischen Bindung an den Insulinrezeptor wurde im 125J-Insulin-Verdrängungstest an Rattenleber-Plasmamembranen geprüft. Man erhielt dosisabhängige Verdrängungskurven, die mit der Kurve

von Rinderinsulin verglichen wurden. Vergleiche der variierten Insuline miteinander ermöglichten Aussagen über die Bedeutung einzelner Aminosäure-Positionen für die Rezeptorbindung.

6.2.1.3. Bestimmung der blutzuckersenkenden Wirkung und der Stimulation des Glucoseeinbaus in Zwerchfell und Nebenhodenfettgewebe der Maus

Es erschien sinnvoll, die Prüfung der enzymatisch synthetisierten Insulinvarianten auf hypoglykämische Wirkung mit der gleichzeitigen Kontrolle ihrer organotropen Einflüße zu koppeln. Zum einen konnten dadurch direkte Zusammenhänge zwischen Blutzuckersenkung und Glucoseaufnahme in einzelne Gewebe beobachtet werden, zum andern diente dies dem Bestreben, den Versuchstierverbrauch einzuschränken, der bei anderen Ganztiertests oftmals sehr hoch war. Ziel der Untersuchungen war es, am Beispiel des Mäusediaphragmas und Nebenhodenfettkörpers herauszufinden, ob Modifikationen der Insulinsequenz die Hormonsensibilität histologisch unterschiedlicher Organe, hier Muskel- und Fettgewebe, verschieden stark beeinflußen würden.

6.2.1.4. Antigene Eigenschaften der Insulinderivate Radioimmunoassay mit Meerschweinchen-Antikörpern gegen Schweineinsulin

Eine andere Fragestellung wurde mit dem Radioimmunoassay untersucht. Bisher war wenig geklärt, welchen Stellenwert der C-Terminus der B-Kette (B23-30), besonders aber die Aromatensequenz B24-26, für die Bindung an den Anti-Insulin-Antikörper hatte. Untersuchungen wurden in der Vergangenheit von Inouye et al. (19) und von Kobayashi et al. (20,23) vorgenommen. Beide Autoren fanden, daß die Substitution von Phe-B24 mit anderen Aminosäuren die Affinität zum Antikörper stark reduzierte, während Phe-B25 ohne Affinitätsminderung ersetzt

werden konnte. Vergleiche der Insulin-Antikörper-Bindungskurven der neu dargestellten Analoga untereinander sollten genauere Aufschlüsse über die verschiedenen Erkennungsmerkmale der Insulinstruktur für den Antikörper liefern.

6.2.2. Untersuchung der semisynthetischen Insuline

Zur Klärung der Frage der Bedeutung der einzelnen aromatischen Aminosäuren der Sequenz Phe-Phe-Tyr (B24-26) wurden die chemisch- bzw. enzymatisch-semisynthetisch dargestellten Insulinanaloga in vitro und in vivo auf ihre biologische Aktivität geprüft.

6.2.2.1. In vitro-Untersuchung in der Glucoseoxidation der Fettzellen

Auf chemischen Semisynthesewege (5) dargestellt, waren die Ala-B27-Insulinvarianten im Fettzelltest nur wenig aktiv. Die Wirkungsverluste, die selbst beim relativ wirksamsten Derivat AlaB27-DTrI bereits 80-90% der ursprünglichen Insulinaktivität betrugen, waren offensichtlich auf die Nebenreaktionen in Synthese und Aufarbeitung (70) zurückzuführen. Wegen dieser niedrigen biologischen Aktivitäten wurde die chemische Semisynthesemethode nicht weiter verfolgt.

Die Synthesen der aktivsten Produkte, AlaB27-DTrI (µ15%), AlaB26-AlaB27-DTrI (ca.5%), AlaB25-AlaB27-DTrI (3-5%), AlaB24-AlaB27-DTrI (ca0,2%) und AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI (8-9%) wurden auf enzymatischen Wege wiederholt.

Die enzymatisch synthetisierten Analoga zeigten im Fettzelltest teilweise viel höhere, dem nativen Insulin vergleichbare Aktivitäten.

Dennoch hatten chemisch und enzymatisch hergestellte Insuline eine gemeinsame Eigenschaft: Alle Analoga waren wie Insulin in der Lage, die Glucoseoxidation der Fettzellen in geeigneten Konzentrationsbereichen dosisabhängig zu stimulieren und in genügend hohen Dosen denselben Maximalwert zu erreichen.

Auch Desoctapeptidinsulin, das B23-30-verkürzte Ausgangsprodukt der Semisynthese, besaß diese Eigenschaften. Seine Dosis-Wirkungskurve war um etwa drei Zehnerpotenzen nach höheren Konzentrationen verschoben; es hatte weniger als 0,1% Aktivität.

Dies bestätigte die Befunde von Kikuchi et al.(26), die die intrinsische Aktivität des Desoctapeptidinsulins nachgewiesen hatten. Sie schloßen daraus, daß das "aktive Zentrum" des Insulins auf dem DOI-Rumpf läge und damit dem Octapeptid B23-30 der B-Kette vor allem Verstärkerfunktion zukäme.

Die Variation der aromatischen Aminosäurepositionen B24-26 machte deutlich, daß die Aminosäuren in B24, B25 und B26 verschiedenes Gewicht hatten. War AlaB27-Destripeptidinsulin mit der vollständigen Aromatensequenz in der Glucoseoxidation nahezu voll aktiv und vom Insulin nicht signifikant zu unterscheiden, so zog die Substitution der Phenylalanine B24 und B25 große Aktivitätsverluste nach sich.

Ala-B24 reduzierte die Aktivität auf 0,7%, Ala-B25 auf 8,3% der Insulinaktivität. Gly-B24 senkte die Wirkung dagegen mit 17,9% bei weitem nicht so stark wie Gly-B25, das sie unter 1% sinken ließ.

Die Substitution des Tyr-B26 allein blieb fast ohne Folgen. Alanin vermochte es mit 97% vollständig, Glycin mit 80,5% weitgehend zu ersetzen.

Ersetzte man zwei Aromaten gleichzeitig, so fiel die Aktivität der Insulinvarianten meist stark. Mit 27,1% war das AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI noch am wirksamsten. Die Glycin-Derivate GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI(3,4%), GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI (1%) und GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI blieben nur wenig aktiv.

6.2.2.2. Bindungseigenschaften der Insulinvarianten

Die aromatischen Aminosäuren der C-terminalen Insulin-B-Kette sind nach der These von Pullen et al. (13) für die Bindung an den Insulinrezeptor sehr wichtig. Diese entwicklungsgeschichtlich äußerst konservative Sequenz (80) bildet nach Ansicht der Autoren eine zur Rezeptorbindung prädestinierte hydrophobe Region, deren Bindungseigenschaften durch Substitution mit anderen Aminosäuren stark verändert werden können. Die enzymatisch dargestellten Derivate der vorliegenden Arbeit und Veröffentlichungen anderer Autoren (15-20,22,23,25-28) belegen dies.

Einige der neu synthetisierten Insulinanaloga demonstrierten am Insulinrezeptor isolierter Rattenleber-Plasmamembranen überraschende Bindungseigenschaften. AlaB27-DTrI, AlaB26-AlaB27-DTrI und GlyB26-AlaB27-DTrI, die aktivsten Derivate im Fettzelltest, hatten 1,7- bis 2-fach höhere Affinität zum Rezeptor als Rinderinsulin. Auch GlyB24-AlaB27-DTrI mit nahezu 100% und AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI mit 75-80% banden erstaunlich gut. Selbst GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI hatte noch 30-50% Affinität zum Rezeptor. Die anderen Varianten hatten, wie nach dem Fettzelltest erwartet, geringere Neigung zur Rezeptorbindung. Prozentual lagen ihre Bindungswerte um Faktor 2 bis 10 über den Aktivitäten in der Glucoseoxidation. Die verglichen mit Rinderinsulin höhere Affinität einzelner Derivate mußte auf das Fehlen der C-terminalen Aminosäuresequenz der Rinderinsulin-B-Kette, Pro-Lys-Ala(B28-30) und den C-terminalen Abschluß der Aromatensequenz B24-26 mit Alanin in B27 zurückgeführt werden. Offensichtlich verminderte die Abwesenheit der e-Aminogruppe des Lys-B29 und das terminale Ala-B27 die Polarität des B-Kettenendes so stark, daß die hydrophobe Region der Aromaten leichter an den Rezeptor binden konnte. Es war dabei nicht auszuschließen, daß die Aminosäure in B27 ebenfalls voll an der Rezeptorbindung beteiligt war.

6.2.2.3. Interpretation der in vitro bestimmten Eigenschaften der variierten Insuline

Stellt man die Resultate von Bindung und biologischer In vitro-Wirkung einander gegenüber, zeigt sich, daß sie quantitativ nicht vergleichbar sind. Offensichtlich bestehen zwischen den zwei Meßsystemen verschiedener Organherkunft entweder Unterschiede in der Affinität ihrer Insulinrezeptoren oder in der Vermittlung des Insulinsignals vom Rezeptor in die Zelle. Man kann jedoch qualitative Vergleichsreihen der Insulinvarianten erstellen:

AlaB27-DTrI und AlaB26-AlaB27-DTrI sind ungefähr gleich biologisch aktiv und binden ähnlich stark am Rezeptor. Bindung und Wirkung nehmen in der Reihe AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI › AlaB25-AlaB27-DTrI › AlaB24-AlaB27-DTrI ab.

Analoges beobachtet man in der Reihe der Glycin-Derivate: GlyB26-AlaB27-DTrI = AlaB27-DTrI › GlyB24-AlaB27-DTrI › GlyB25-GlyB26-Ala-B27-DTrI › GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI = GlyB25-AlaB27-DTrI › GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI.

Die Ergebnisse der In vitro Aktivitäts- und Bindungsstudien geben zahlreiche Hinweise dafür, daß mehrere Strukturmerkmale des untersuchten Abschnitts der B-Kette mit unterschiedlichen Gewichten gemeinsam für Rezeptorbindung und biologische Wirkung verantwortlich sind: Hierfür kommen spezifische Aminosäuren, synergistisches Zusammenwirken dieser Aminosäuren in benachbarten Positionen, hydrophobe Eigenschaften und die Sekundärstruktur dieser Region.

Die Phenylalanine in B24 und B25, dies steht außer Zweifel, sind für Bindung und biologische Wirkung spezifisch notwendig. Ersetzt man eines oder beide, so werden Rezeptoraffinität und Aktivität mehr oder minder stark reduziert. Phe-B24 scheint dabei mehr die Bindungsstärke, weniger die Spezifität der Bindung, zu beeinflussen, denn, ausgenommen das Gly-B25-Analoge besitzen alle B25- und B25,26-substituierten Derivate höhere Rezeptoraffinitäten und biologische Aktivitäten als die B24- und B24,26- substituierten Analoga.

Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigen dies. Insuline mit Alanin (19), Leucin (16-20,22) und Serin (23) in B24 und B25, von Tager et al. (16), Gattner et al. (17), Inouye et al. (18,19) und Kobayashi et al. (20,23) semisynthetisch dargestellt, zeigen reduzierte Rezeptoraffinitäten und biologische Wirkungen, deren Größenordnung vom Ort der Substitution und der Art der Aminosäure abhängen.

Alanin, in Thr-B30-Rinderinsulin (19) und Serin, in Humaninsulin (23) eingesetzt, senken Affinität und Wirkung in B24 stärker als in B25. Leucin vermindert sie umgekehrt in B25 mehr als in B24 (16-20). Demgegenüber verbessert D-Phe, von Kobayashi et al. (25) semisynthetisch in Humaninsulin eingeführt, Rezeptorbindung und Aktivität in B24 sogar gegenüber dem natürlichen Ausgangsprodukt, während es diese in B25 drastisch reduziert.

Die Effektivität des Phe-B25 scheint nach den vorliegenden Resultaten von den Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren abhängig zu sein. Glycin reduziert z.B. im GlyB24-AlaB27-DTrI die Rezeptoraffinität nur um etwa die Hälfte, wenn Tyr in B26 vorhanden ist. Ist aber neben Phe-B24 auch Tyr-B26 von Glycin substituiert, so sinken Affinität und Aktivität drastisch. Demgegenüber wirkt Alanin in B24 übereinstimmend mit der Literatur (19) weit stärker affinitäts- und aktivitätsmindernd.

Wird Gly in B24 eingesetzt, dann scheint es durch seine um einen Freiheitsgrad erweitere Beweglichkeit gegenüber L-Aminosäuren der anschließenden Sequenz Phe-Tyr-Ala (B25-27) die Orientierung am Rezeptor so zu erleichtern, daß sie dort besser binden kann. Alanin schränkt dagegen die Beweglichkeit dieser Sequenz offensichtlich ein und ruft dazu möglicherweise noch Änderungen der Sekundärstruktur der Region B24 - 27 hervor, die die Rezeptorbindung drastisch einschränken.

Das GlyB24-Analoge verhält sich ähnlich wie die in der Literatur beschriebenen LeuB24-Insuline (16-20): Die LeuB24-Analogen des Schweine- bzw. Humaninsulins sind wie GlyB24-AlaB27-DTrI in Rezeptoraffinität und biologischer Aktivität weniger eingeschränkt als das AlaB24-Analoge dieser Arbeit

bzw.der Literatur (19). Glycin und Leucin scheinen hier gleichermaßen die Orientierung der anschließenden Sequenz B25-27 am Rezeptor weniger als Alanin oder auch Serin (23), das sich analog zu Ala-B24 verhält, zu ändern. Ist dies bei Gly-B24, wie oben ausgeführt, auf seine erweiterte Beweglichkeit zurückzuführen, so scheint Leu-B24, das als L-Aminosäure wie Ala und Ser weniger beweglich ist, durch seinen voluminösen Seitenrest,der zum einen ein sterisches Hindernis bilden, zum andern hydrophobe Wechselwirkungen eingehen kann, die Form der Sekundärstruktur der Region B24-26 in rezeptorbindungsbegünstigter Konformation festzulegen. Die kleineren Aminosäuren Alanin, das polarer als Leucin ist und das hydrophile Ser induzieren dagegen offensichtlich eine ungünstigere Konformation,da bei ihnen sterische Hinderung und hydrophobe Wechselwirkungen weniger möglich sind.

Das GlyB25-Derivat ist dagegen wie die LeuB25-Insuline (16-20) schwach aktiv. Mitten im Aromatenkomplex plaziert, scheinen Glycin die Rezeptorbindung durch seine Beweglichkeit in ungünstiger Weise zu beeinflußen, während die voluminöse Seitenkette des Leucin den gleichen Effekt als sterisches Hindernis bewirken kann. Beide können den offensichtlich spezifisch notwendigen Phenylrest des Phe-B25 nicht ersetzen.

Das semisynthetische Analoge GlyB24-DTrI, die LeuB24-Insuline (16-20) und D-Phe-B24-Insulin (23) demonstrieren im Vergleich mit ihren B25-Varianten die Bedeutung des Phe-B25, das in Verbindung mit geeigneten Aminosäuren in B24 die Rezeptorbindung stärker beeinflußt als Phe-B24.Offensichtlich ist die Posititon B24 weniger spezifisch von L-Phe abhängig, sondern bestimmt mehr die Stärke der Rezeptorbindung. Zu dieser Auffassung gelangten auch Kobayashi et al. (25), die Phe-B25 die Schlüsselposition zur Rezeptorbindung zuwiesen, während sie Phe-B24 für die Affinität verantwortlich machten.

Fehlen beide Phe, wie im GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI und im LeuB24-LeuB25-Insulin (18,19,22), so sind Bindung und Wirkung drastisch reduziert. Dies zeigt klar, daß Tyrosin-B26 allein keinen Einfluß auf beide Parameter hat . Tyr-B26 ist selbst bei Anwesenheit beider Phe, B24 und B25, nicht erforderlich. Inouye et al. (19) fanden für AlaB26-ThrB30-Rinderinsulin volle Bindungs- und Stoffwechselaktivität. Die Synthesen von AlaB26-AlaB27-DTrI und GlyB26-GlyB27-DTrI bestätigen dies, da die neuen B26-substituierten Analogen in ihren Bindungseigenschaften und biologischen Aktivitäten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollsubstanz AlaB27- DTrI zeigen.
Überraschend sind sogar TyrB26-haltige B25-monosubstituierte Analoge weniger aktiv als ihre korrespondierenden B25,B26-disubstituierten Varianten. Die Insulinderivate binden in der Reihenfolge GlyB25-AlaB27-DTrI < AlaB25-AlaB27-DTrI < GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI < AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI zunehmend besser am Rezeptor.

Hier behindert Tyrosin scheinbar die Insulin-Rezeptor-Wechselwirkung. Dies kann man auf zwei mögliche Ursachen zurückführen:

1. Der aromatische Tyrosinrest mit der phenolischen Hydroxylgruppe reduziert die Stärke der Bindung, die von Phe-B25 und den hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren B25-27 bestimmt wird.
2. Die Sekundärstruktur der C-terminalen B-Kette ist ohne den stabilisierenden Einfluß des Phe-B25 leichter zu verändern, was die Rezeptorbindung erschweren kann.

Die Behinderung der Rezeptorbindung durch Tyr-B26 ist hier wahrscheinlich auf seine phenolische Hydroxylgruppe zurückzuführen, die die hydrophoben Eigenschaften der Region B24-27 negativ beeinflußt. Ihre hydrophilen Eigenschaften erhöhen die Polarität dieser Region und können dadurch die Rezeptoraffinität reduzieren. Der Wegfall dieses Einflußes vermag die höhere Affinität der disubstituierten Derivate gegenüber den monosubstituierten erklären.

Andererseits können die hydrophilen Eigenschaften der Tyrosin-Seitenkette die Sekundärstruktur des B-Ketten-C-Terminus, induziert durch die Aminosäure B25, so beeinflussen, daß die Rezeptorbindung erschwert wird. Besonders leicht ist dies im GlyB25-AlaB27-DTrI möglich, da die dem Glycin eigene erweiterte Beweglichkeit solche vom Tyrosin ausgehenden Änderungsbestrebungen zu begünstigen in der Lage ist (siehe auch S.107 und S.108).

Die potentielle Strukturänderung im Aromatenbereich bekommt unter Berücksichtigung der Literatur Gewicht: LeuB25-Insuline (16-20) und D-PheB25-Insulin (25) besitzen sehr niedrige Affinität zum Insulinrezeptor. Dies ist zum einen mit dem Fehlen des Phe-B25 als Schlüsselaminosäure (25), zum andern aber auch mit möglichen Änderungen der Sekundärstruktur,verursacht durch die veränderte chemische Umgebung B24/25 und B25/26, zu begründen.

Weiter ist zu diskutieren, ob der potentiell hemmende hydrophile Einfluß des Tyr-B26 nicht vom ausgeprägt hydrophoben Phe-B25 geschwächt oder neutalisiert wird. Es enstünde wie in GlyB24-AlaB27-DTrI ein relativ hydrophober Komplex, der gute Bindungseigenschaften besitzt.

Hydrophobe Eigenschaften der Region B24-27 fördern offensichtlich zusätzlich die Affinität der Insulinderivate zum Rezeptor. Dies demonstrieren GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI und dessen methylierte Form AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI. Hier verdoppelt sich beinahe die Fähigkeit zur Rezeptorbindung in der durch Methylierung hydrophober gewordenen Form Auch die Steigerung vom disubstituierten GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI zum monosubstituierten GlyB24-AlaB27-DTrI kann hydrophoben Einflüssen zugeschrieben werden. Tyr-B26 scheint, wie bereits erwähnt, mit Phe-B25 zusammen als unpolare Gruppierung besser als das polarere disubstituierte Derivat mit dem Insulinrezeptor in Wechselwirkung zu treten.

6.2.2.4. Bestimmung der biologischen Wirkungen der Insulinanaloga in vivo

Im biologischen Test am Ganztier unterscheiden sich die Aktivitäten der enzymatisch dargestellten Insuline nicht so stark wie in vitro voneinander. Dies macht deutlich, daß der Test nicht so empfindlich wie Glucoseoxidation und Bindungsmeßung ist. Sicherlich kann man dies auf die komplexe Regulation des Glucosemetabolismus zurückführen, für den das Insulin ja nur ein wichtiges Glied neben andern darstellt.

6.2.2.4.1. Blutzuckersenkende Eigenschaften

Die neu dargestellten Derivate wirken in geeigneten Dosen voll blutzuckersenkend. Genauso aktiv wie Insulin sind die drei in vitro hochwirksamen Analoga AlaB27-DTrI, AlaB26-AlaB27-DTrI und GlyB26-AlaB27-DTrI. Erstaulicherweise erreichen aber auch AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI volle, GlyB24-AlaB27-DTrI und GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI nahezu die volle Insulinaktivität. Die anderen Derivate zeigten erst in höheren Dosen hypoglykämische Wirkung. So waren die B25-substituierten AlaB25-AlaB27-DTrI und GlyB25-AlaB27-DTrI noch zu 30-40% aktiv. AlaB24-AlaB27-DTrI und GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI senkten weniger als 15-20%, GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI unter 4%.

Vergleicht man Rezeptorbindung und Blutzuckersenkung, so erkennt man, daß alle Derivate, die mehr als ca. 30-50% der Rezeptoraffinität des Insulins besitzen, den Blutzuckerspiegel nahezu mit derselben Dosisabhängigkeit wie Insulin selbst senken können. Die schwach bindenden Derivate entfalten dagegen auch in der Blutzuckerregulation geringe Aktivität.

Die Substitution des Phe-B24 mit Gly hat nur geringe schwächende Einflüße, mit Ala dagegen mehr als 80% Aktivitätsverlust zu Folge. Ersetzt man aber Phe-B25 durch Ala oder Gly, so fällt die hypoglykämische Wirkung auf 30-40%. Zweifache Substitution in B25 und B26 verändert wiederum die blutglucosesenkende Aktivität kaum. Dies bestätigt die in vitro ermit-

telten Befunde, die auf die aktivitätsmindernde Eigenschaft des Tyr-B26 bei B25-variierten Derivaten hinweisen.

Die von Inouye et al. (18,19) enzymatisch dargestellten, mit Ala in B24, B25 und B26 monosubstituierten ThrB30-Rinderinsuline hatten mit den AlaB27-Derivaten dieser Arbeit vergleichbare Insulinaktivität.

6.2.2.4.2. Einbau von U-14C-Glucose in Zwerchfell und Fettgewebe der Maus

Die B24-26-variierten AlaB27-Destripeptidinsuline stimulieren die Glucoseeinbaurate in Zwerchfell und epididymalem Fettgewebe der Maus in derselben Größenordnung wie sie die Blutglucose erniedrigen. Die Aufnahme ins Fettgewebe scheint dabei von Substitutionen im Aromatenbereich nicht so empfindlich betroffen wie der Einbau ins Zwerchfell. Deutlich wird dies bei Betrachtung der Fettgewebeeinbauraten der mäßig hypoglykämisch wirksamen GlyB25- bzw. AlaB25-AlaB27-DTrI, die wie die anderen stark senkenden Derivate zu 80-100% einbauaktiv sind. Nur AlaB24-AlaB27-DTrI, GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI und GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI stimulieren ihrer hypoglykämischen Wirkung entsprechend schwächer.

Die Glucoseaufnahme ins Zwerchfell wird dagegen offensichtlich stärker beeinflußt. Hier sind nur die auch in vitro hoch aktiven Derivate voll wirksam. Die in vitro schwächeren, stark blutzuckersekenden GlyB24-AlaB27-DTrI und AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI fördern den Zwerchfelleinbau noch zu 50%-80%, GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI weniger als 50%. Die Wirkung der B25-substituierten Ala- bzw. Gly-Derivate ist ebenso um mehr als 50% vermindert.Die drei schwach hypoglykämischen Derivate sind noch weniger einbauaktiv.

Liegen auch die in vivo ermittelten biologischen Aktivitäten, besonders die der schwächeren Derivate, höher als in vitro, so ändern sie sich doch in ihrer Reihenfolge zueinander nur wenig. Dies unterstreicht die aus den In vitro-Resultaten abgeleitete Bedeutung der einzelnen Aminosäurepositionen.

6.2.2.5. Antigene Eigenschaften

Die Aromaten der C-terminalen B-Kette sind Teil der Erkennungsmerkmale des Insulins für den Anti-Insulin-Antikörper. Dies geht aus den Antikörper-bindenden Eigenschaften der semisynthetischen Destripeptidinsuline deutlich hervor. Offensichtlich sind jedoch die C-terminale Sequenz Pro-Lys-Ala (B28-30) aus der natürlichen Primärstruktur des Rinderinsulins, die in den Destripeptidinsulinen fehlt und Thr-B27, hier durch Ala-B27 ersetzt, mitbeteiligt, denn AlaB27-DTrI besitzt mit der kompletten Aromatensequenz nur 60-70% der Rinderinsulinaffinität zum Antikörper.

Phe-B24 scheint die Schlüsselaminosäure der Antikörper-Bindung zu sein, da alle Phe-B24 enthaltenden Derivate mindestens 20% der Affinität des Rinderinsulins, B24-substituierte Derivate dagegen mit weniger als 1o-15% signifikant geringere Antikörperaffinität besitzen.

Phe-B25 steigert nach den Meßergebnissen die von Phe-B24 initiierte Bereitschaft zur Wechselwirkung mit dem Antikörper auf ca. 50%.

Tyr-B26 erhöht dagegen die Antikörperbindung scheinbar nur in Verbindung mit beiden Phe, B24 und B25. Sind B24 und B25 wie im GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI ersetzt, so ist die verbliebene Restaffinität des nur noch Tyr-B26 enthaltenden Derivats ca. 5%. Die TyrB26-haltigen B25-monosubstituierten und die B25,B26-disubstituierten Derivate unterscheiden sich in ihrer Antigenität kaum. Alle vier dargestellten Derivate besitzen 20-25% antigene Wirkung. Dies läßt darauf schließen, daß Tyr-B26 die Antikörperbindung nur in untergeordnetem Maße beeinflußt.

Die antigenen Eigenschaften der Destripeptidinsuline stehen scheinbar im Widerspruch zu den Befunden von Inouye et al. (19) und Kobayashi et al. (20,23). Zwar weisen auch sie dem Phenylalanin in B24 die wichtigste Rolle in der Antikörperbindung zu, jedoch besitzen ihre mit Alanin (19), Leucin (19, 20) und Serin (23) B25-substituierten Insuline 100% Insulinantigenität, während die AlaB25- und GlyB25-substituierten

AlaB27-Destripeptidinsuline nur 20-25% Antigenität zeigen. Möglicherweise kompensieren aber die C-terminalen Aminosäuren B28-30 des nativen Insulins die Substitution des Phe-B25, ein Effekt, der bei den B28-30-verkürzten Destripeptidinsulinen entfiele.

Übereinstimmend mit den vorliegenden Resultaten berichten verschiedene Autoren (19,20,23) über die drastische Reduktion der Antikörperaffinität bei Substitution des Phe-B24 mit Ala, Leu und Ser. Auch die Substitution von Tyr-B26 mit Ala ist mit ca. 30% Affinitätsminderung verbunden.

Trotz Unstimmigkeiten mit der Literatur steht fest, daß die Sequenz Phe-Phe-Tyr (B24-26) als hydrophobes Kerngebiet des Insulinmoleküls wesentlichen Anteil an dessen antigenen Eigenschaften hat.

6.2.3. Schlußbemerkungen

Aus den vorliegenden Resultaten geht hervor, daß offensichtlich mehrere spezifische Merkmale und Eigenschaften der Sequenz der C-terminalen B-Kette für die Verstärkung der Bindung an den Insulinrezeptor und der biologischen Aktivität zusammenwirken müssen.

Um die volle, in allen Konzentrationsbereichen mit dem nativen Insulin vergleichbare Bindungsfähigkeit und biologische Aktivität zu erreichen, sind zum einen die Phenylalanine in B24 und B25, zum anderen eine Mindestlänge der C-terminalen B-Kette, die die Aminosäure B27 einschließt notwendig.

Dies wird auch durch die Ergebnisse von Riemen et al.(28) bestätigt, die den von Weitzel et al. (5) in vivo nachgewiesenen Anstieg der Insulinaktivität in drei Stufen bei sukzessiver Verlängerung von Desoctapeptidinsulin um die Aminosäuren Gly-B23, Phe-B24, Phe-B25 und Tyr-B26 in vitro nachvollzogen. Riemen et al. stellten die von Weitzel und Mitarbeitern chemisch-semisynthetisch erzeugten verkürzten Insuline über die kombinierte enzymatisch-chemische Semisynthese nach Canova-Davis & Carpenter(81) her und untersuchten sie in

Bindungs-, Glucosetransport- und Lipogenesetests an isolierten Fettzellen. Sie erhielten Insulinderivate, deren Aktivitäten in vitro dieselbe Größenordnung wie die vorher (5) bestimmten In vivo-Aktivitäten hatten. Auch sie erreichten nicht die volle, sondern nur ca.60% Insulinaktivität. Volle Insulinwirkung erhält man erst, wenn man, wie Weitzel et al. (5-7,11) mit Alanin, Katsoyannis mit den Alkohol- bzw. Aldehydformen des Threonins (11) in B27 in vivo und die enzymatische Semisynthese des AlaB27-DTrI der vorliegenden Arbeit in vitro und in vivo zeigten, die Sequenz um die Aminosäure B27 verlängert.

Hydrophobe Eigenschaften der Region B24-27 fördern die Bindungsfähigkeit des Insulins an den Rezeptor der Hepatozyten-Plasmamembran, wie die Bindungseigenschaften verschiedener Destripeptidinsuline demonstrieren.

Substitution der Phenylalanine B24 und B25 führt meist zu stärkeren Verlusten biologischer Aktivität und Rezeptoraffinität. Die Reduktion dieser Fähigkeiten hängt von der Art der substituierenden Aminosäure ab. Die erzielten Resultate lassen den Schluß zu, daß einige Derivate besonders niedrige Affinität und Wirkung hervorrufen, weil die substituierende Aminosäure Strukturänderungen in der rezeptorbindenden Region hervorruft, die die Interaktion von Derivat und Rezeptor behindern.

Die C-terminale Insulin-B-Kette bildet einen wesentlichen Teil der Bindungsstelle für den Anti-Insulin-Antikörper. Auch hier kommt den aromatischen Aminosäuren die größte Bedeutung zu. Phenylalanin-B24 ist die Schlüsselaminosäure zur Verstärkung der Antikörperbindung.

7. Zusammenfassung

Auf dem Wege der chemischen und enzymatischen Semisynthese wurden Destripeptidinsuline mit C-terminalem Alanin-B27, die man in den Positionen B24-26 der Insulin-B-Kette variierte, dargestellt. Man baute die semisynthetischen Insuline aus geschütztem Desoctapeptidinsulin und Pentapeptidmethylestern, die zuvor nach den klassischen Methoden der Peptidsynthese hergestellt wurden, auf.

Die chemisch-semisynthetisch nach WEITZEL und Mitarbeitern gekuppelten Destripeptidinsuline, die in B24-26 mit Alanin variiert worden waren, erwiesen sich im biologischen Test in vitro an isolierten Fettzellen als sehr wenig aktiv. Die geringe Aktivität der Derivate konnte auf Nebenprodukte, die während Synthese und Aufarbeitung entstanden und bei dieser Methode weder zu vermeiden, noch abzutrennen waren, zurückgeführt werden.

Wesentlich bessere Resultate wurden mit der enzymatischen Semisynthesemethode von INOUYE et al. erzielt: Die variierten Insulin-Analoga konnten nach mehrstufiger Reinigung über Gel- und Ionenaustauschchromatographie rein dargestellt werden.

Sie unterschieden sich in den verschiedenen biologischen Aktivitätsprüfungen - abhängig vom Ort der Substitution und der substituierenden Aminosäure - teilweise erheblich vom nativen Ausgangsprodukt, dem Rinderinsulin.

Biologische Aktivität (% der Rinderinsulinaktivität):

AlaninB27-Des-(B28-30)-tripeptidinsulin (= AlaB27-DTrI):

1. Glucoseoxidation an isolierten epididymalen Fettzellen der Ratte: 88,0%;
2. Insulinrezeptorbindung an Plasmamembranen der Rattenleber: 170-190%;
3. Affinität zum Anti-Schweineinsulin-Antikörper des Meerschweinchens: 60-70%;

4.a) Blutzuckersenkung: ca. 100%;
U-14C-Glucoseeinbau in: b) Zwerchfell: ca. 100% und
c) Nebenhodenfett der Maus: ca. 100%.

AlaB24-AlaB27-DTrI: 1. 0,7%; 2. 6-7% 3. 10-20%;
4.a) <20%; b) 5-10%; c) <20%.

AlaB25-AlaB27-DTrI: 1. 8,3%; 2. 18-19%; 3. 20-30%
4.a) 30-40%; b) ca. 50%; c) 80-100%.

AlaB26-AlaB27-DTrI: 1. 97,0%; 2. 165-180%; 3. 40-50%;
4.a) ca. 100%; b) ca. 100%; c) ca. 100%.

AlaB25-AlaB26-AlaB27-DTrI: 1. 27,1%; 2. 75-80%; 3. 20-25%;
4.a) ca. 100%; b) 50-80%; c) 80-100%.

GlyB24-AlaB27-DTrI: 1. 17,9%; 2. 90-100%; 3. 10-15%;
4.a) 80-90%; b) 50-80%; c) ca. 100%.

GlyB25-AlaB27-DTrI: 1. 0,95%; 2. 12-15%; 3. 20-25%;
4.a) ca. 40%; b) ca. 40%; c) ca.100%.

GlyB24-GlyB25-AlaB27-DTrI: 1. 0.4%; 2. 2-3%; 3. 4-6%;
4.a) <4%; b) <1%; c) 10-20%.

GlyB26-AlaB27-DTrI: 1. 80,5%; 2. 190-210%; 3. 45-55%;
4.a) ca. 100%; b) ca. 100%; c) ca. 100%.

GlyB24-GlyB26-AlaB27-DTrI: 1. 1,0%; 2. 10-12%; 3. 5-10%
4.a) 20-30%; b) 20-30%; c) 20-40%.

GlyB25-GlyB26-AlaB27-DTrI: 1. 3,4%; 2. 30-50%; 3. 20-25%;
4.a) <50%; b) <50%; c) 80-100%.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Aromatensequenz Phe-Phe-Tyr (B24-26) die Bindung und Wirkung des Insulins in vivo und in vitro verstärkt. Offensichtlich müssen dabei meh-

rere spezifische Merkmale und Eigenschaften dieses C-terminalen B-Kettenabschnitts zusammenwirken. Von entscheidender Bedeutung sind die Phenylalanine B24 und B25. Ihre Substitution führt meist zu stärkeren Verlusten biologischer Aktivität und Rezeptoraffinität. Phe-B24 scheint dabei mehr die Affinität der Rezeptorbindung zu beeinflußen und Phe-B25 die Schlüsselposition zur Bindung einzunehmen. Dies wird durch Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Die Reduktion von Bindung und Wirkung bei Substitution in diesen Positionen hängt von der Art der substituierenden Aminosäure ab. Die Eigenschaften einiger wenig aktiver Analoga lassen den Schluß zu,daß die substituierende Aminosäure Strukturänderungen in der rezeptorbindenden Region des Insulins hervorruft, die die Wechselwirkung von Derivat und Rezeptor behindern.

Dagegen wirkt sich die Substitution des Tyr-B26 mit Ala oder Gly auf die biologischen Wirkungen des Insulins kaum aus.

Die überraschend hohen Rezeptoraffinitäten einiger Derivate geben Hinweise darauf, daß besonders hydrophobe Eigenschaften der Region B24-27 die Bindungsfähigkeit an den Insulinrezeptor fördern.

Die antigenen Eigenschaften des Insulins werden durch die Sequenz B24-26 entscheidend geprägt, denn die C-terminale Insulin-B-Kette ist Teil der Anti-Schweineinsulin-Antikörper-Bindungsstelle. Auch hier üben die Aromaten den größten Einfluß auf die Affinität aus. PheB24 kommt die Schlüsselfunktion zu, während PheB25 und TyrB26 dessen Wirkung sukzessive verstärken. Zum Erreichen der vollen Antikörper-Affinität ist offensichtlich aber die den Destripeptidinsulinen fehlende Sequenz der C-terminalen Aminosäuren B28-30 notwendig.

8. Literatur

1) Weitzel, G., Eisele, K., Guglielmi, H., Stock, W. & Renner, R. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1735-1738

2) Nicol, D.S.H.W. (1960) Biochem. J. 75, 395-401

3) Young, J.D. & Carpenter, F.H. (1961) J. Biol. Chem. 236, 743-748

4) Carpenter, F.H. & Baum, W.E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 409-412

5) Weitzel, G., Bauer, F.U. & Eisele, K. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 187-200

6) Bromer, W.W. & Chance, R.E. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133, 219-233

7) Weitzel, G., Eisele, K., Zollner, H. & Weber, U. (1969) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1480-1483

8) Weitzel, G., Eisele, K., Schulz, V. & Stock, W. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 321-330

9) Eisele, K. (1970) Dissertat. rer.nat., Univ. Tübingen

10) Weitzel, G., Eisele, K., Guglielmi, H., Stock, W. & Schulz, V. (1973) Peptide 1972, Proc. 12 th. Eur. Peptide Symposium, Reinhardsbrunn, Sept. 1972 (Hanson, H. & Jabubke, H.D., eds.) pp 292-298, North Holland Publ. Comp. Amsterdam

11) Katsoyannis, P.G., Zalut, C., Harris, A. & Meyer, R.J. (1971) Biochemistry 10, 3884-3889

12) Weitzel, G., Eisele, K. & Stock, W. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 583-590

13) Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Wood, S.P., Tickel, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J. & Gammeltoft, S. (1976) Nature (London) 259, 369-373

14) Tager, H., Given, B., Baldwin, D., Mako, M., Markese, J., Rubenstein, A., Olefsky, J., Kobayashi, M., Koltermann, O. & Poucher, R. (1979) Nature (London) 281, 122-125

15) Olefsky, J.M., Saekow, M., Tager, H. & Rubenstein, A.H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6098-6105
16) Tager, H., Thomas, N., Assoian, R., Saekow, M., Olefsky, J. & Kaiser, E.T. (1980) Biochemistry 77, 3181-3185
17) Gattner, H.G., Danko, W., Behn, C. & Zahn, H. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1135-1138
18) Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kanaya, T.,Kobayashi, M. & Shigeta, Y. (1981a) Experientia 37, 811-813
19) Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kanaya, T., Kobayashi, M. & Shigeta, Y.(1981b) Biopolymers 20, 1845-1858
20) Kobayashi, M., Oghaku, S., Iwasaki, M., Maegawa, H., Shigeta, Y. & Inouye, K. (1982) Biochem. J. 206, 597-603
21) Inouye, K., Watanabe, K., Morihara, K., Tochino, Y., Konaya, T., Emura, J. & Sakakibara, S. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 751-752
22) Jonczyk, A., Keefer, L.M., Naithani, V.K., Gattner, H.-G., De Meyts, P. & Zahn, H. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 557-561
23) Kobayashi, M., Haneda, M., Maegawa, H., Watanabe, N., Takada, Y.,Shigeta, Y. & Inouye, K. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 49-57
24) Haneda, M., Chan, S., Kwok, S., Chan, S., Shoelson, H., Tager, H., Rubenstein, A., Steiner, D. (1983) Diabetes 32, 74 A (abstract)
25) Kobayashi, M., Ohagaku, S., Iwasaki, M., Maegawa, H., Shigeta, Y. & Inouye, K. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 329-336
26) Kikuchi, K., Larner, J., Freer, R.J., Day, A.R., Morris, H. & Dell, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9281-9288
27) Kikuchi, K., Larner, J., Freer, R. J. & Day, A.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9441-9444
28) Riemen, A.W., Pon, L.A. & Carpenter, F.H. (1983) Biochemistry 22, 1507-1515
29) IUPAC-IUB (1966), J. Biol. Chem. 241, 2491-2495
30) IUB (1967) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 256-261
31) Merck, E. (1970) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Fa. E.Merck, Darmstadt

32) Kohn, J. G-I-T (1971) Fachz. Lab. Heft 11, p 1221, Teil 2, Sonderheft
33) Schlösser, K. (1971) Chemie in unserer Zeit 5, 27-28
34) Cellogel-Arbeitsvorschrift CAF/1: Elektrophoretische Bestimmung der Serumproteine auf Cellogel; Serva, Heidelberg
35) Winter, A., Ek, K. & Andersson, U.-B. (1977) Application Note 250 (Methodological), LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden
36) Isoelectric Focusing (principles & methods) (1982) Pharmacia Fine Chemicals AB., Uppsala, Sweden, Printed by Ljungföretagen AB, Örebro, Sweden
37) Sluyterman, L.A. (1955) Biochim. Biophys. Acta 17, 169-176
38) Cui, D., Cao, Q.P., Zhu, S.C., Zhang, X.T. & Zhang, Y.S. (1983) Sci. Sin. 26, 248-254
39) Gattner, H.-G., Schmitt, E.W. & Naithani, V.K. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1465-1467
40) Levy, D. & Carpenter, F.H. (1967) Biochemistry 6, 3559-3568
41) Schnabel, E. (1967) Liebigs. Ann. Chem. 702, 188-196
42) Weber, U. (1976) Z. Naturforsch. 31 b, 1157-1158
43) Brenner, M. & Huber, W. (1953) Helv. Chim. Acta 36, 1109-1115
44) König, W. & Geiger, R. (1970) Chem. Ber. 103, 788-798
45) Hertfelder, H.-J. (1981) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen
46) Mc Kay, K.C., & Albertson, N.E. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686-4690
47) Bauer, F.-U. (1974) Dissertat. rer.nat., Universität Tübingen
48) The Shanghai Insulin Research Group (1973) Sci. Sin. 16, 61-70
49) Gattner, H.-G. & Schmitt, E.W. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 105-113
50) Rodbell, M. (1964) J. Biol. Chem. 239, 375-380

51) Martini, O. & Hahn, J. (1967) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1461-1476
52) Heptner, W. & Christ, O. (1967) Diabetologia 3, 443-448
53) Gliemann, J., Osterling, K., Vinten, J. & Gammeltoft, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 286, 1-9
54) Cuatrecasas, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322
55) Koch, R. (1978) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen
56) Deger, A. (1983) Biochem. Diplomarbeit, Universtät Tübingen
57) Fleischer, S. & Kervina, M. (1974) Methods in Enzymol. 31, 3-41
58) Stein, Y. Widnell, C. & Stein, O. (1968) J. Cell. Biol. 39, 185-192
59) Hunter, W.M. & Greenwood, F.C. (1962) Nature 194, 495-496
60) Koch, R. (1981) Dissertat. rer.nat.Universität Tübingen
61) Desbuquois, B. & Aurbach, G.B. (1971) J. Clin. Endocrinol. 33, 732-738
62) Rafaelsen, O.J., Lauris, V. & Renold, A.E. (1965) Diabetes 14, 19-27
63) Clausen, T. (1965) Acta Endocrinol. (Copenhagen) 50, 115-122
64) Sovik, O. (1966) Acta Physiol. Scand. 68, 246-254
65) Partamian, J., Rasio, G. & Cahill, F. (1966) Metabolism. 15, 70-75
66) Schulz, V. (1972) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen
67) Goethe, J.W.v. (1808) Faust I, Studierzimmer (Pakt), Meph., Zeile 1740
68) Eisele, K. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 845-854
69) Eisele, K., pers. Mitteilung
70) King, G.L., Kahn, R., Samuels, B., Danho, W., Bullesbach, E.E. & Gattner, H.-G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10869-10873

71) Ruttenberg, M.A. (1972) Science 177, 623-626
72) Weitzel, G., Bauer, F.-U. & Eisele, K. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 945-958
73) Ingalls, R.G., Squires, R.G. & Butler, L.G. (1975) Biotech. Bioeng. 17, 1627-1637
74) Butler, L.G. & Reithel, F.J. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 178, 43-50
75) Laskowsky, M.,Jr. (1978) in "Semisynthetic Peptides and Proteins", R.E. Offord & C. Di Bello, Ed. Academic Press, London, pp 255-262
76) Young, D.M. & Lewis, A.H. (1947) Science 105, 368
77) Whitesell, R.R. & Gliemann, J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5276-5283
78) Olefsky, J.M. (1976) J. Clin. Invest. 58, 1450-1460
79) Moody, A.J., Stan, M.A. & Gliemann, J. (1974) Horm. Metab. Res. 6, 12-16
80) Dayhoff, M.O. (1972) in "Atlas of Protein Seqance and Structure, Vol. 5, pp 0-187, National Biochemical Research Foundation, Washington D.C.
81) Canova-Davis, E. & Carpenter, F.H. (1981) Biochemistry 20, 7053-7058

Meine akademischen Lehrer waren:

Physiologische Chemie:	G. Weitzel, D. Mecke, K. Eisele, J. Guglielmi, H. Probst, U. Weber, A. Wendel, U. Weser
Organische Chemie:	E. Bayer, M. Hanack, H. Hagenmaier, W. Voelter
Anorganische Chemie:	E. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie:	H. Mauser, W. Zeil
Physikalische Biochemie:	K. Wegmannn
Anatomie:	K. Mörike, M. Arnold
Botanik:	H. Metzner
Mathematik:	H. Pommmer
Med. Strahlenkunde:	U. Feine, E. Kallée
Mikrobiologie:	H. Zähner
Pharmakologie/Toxikologie:	H. Remmer
Physik:	F. Gönnenwein, H. Krüger
Physiologie:	H. Betz
Zoologie:	K.G. Grell

Lebenslauf

Am 26. Juni 1955 erblickte ich, Hans-Jörg Hertfelder, als erstes Kind des Paul Hertfelder und seiner Ehefrau Elisabeth Maria geb. Schuder in Plattenhardt/Kreis Esslingen das Licht der Welt.

Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Grundschule in Plattenhardt. Im April 1966 wechselte ich auf das Wilhelmsgymnasium in Stuttgart-Degerloch über,wo ich im Mai 1974 das Abitur ablegte.

Anschließend leistete ich den 15-monatigen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1975/76 nahm ich an der Universität Tübingen das Studium der Chemie auf. Im Sommersemester 1976 wechselte ich zum Studiengang Biochemie in Tübingen über. Im September 1976 legte ich den 1., im März 1978 den 2. Teil der Diplomvorprüfung ab. Die mündliche Diplomhauptprüfung in Biochemie folgte im April/Mai 1980.

Von Juni 1980 bis Januar 1981 fertigte ich in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr.Dr. G. Weitzel die Diplomarbeit mit dem Thema: "Semisynthese und biologische Wirksamkeit varierter Insulinanaloga: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin und Glutamin in Postition B22" an.

Im März 1981 begann ich bei Herrn Prof.Dr.Dr. G. Weitzel am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation mit dem Thema: "Semisynthese und biologische Eigenschaften in B24-26 mit Alanin oder Glycin substituierter AlaninB27-Destripeptidinsuline", die ich im Oktober 1984 abschloß.

dissertationsdruck · vervielfältigungen
f. u. t. müllerbader
Forststraße 18 · 7024 Filderstadt 4 (Plattenhardt)
Telefon (07 11) 77 15 67